



**UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO DE JANEIRO** UFRJ

**IDENTIFICAÇÃO DE POTENCIAIS ALVOS MOLECULARES E
NOVAS FERRAMENTAS TERAPÊUTICAS PARA A LEUCEMIA
LINFOBLÁSTICA AGUDA DE PRECURSORES B.**

LEANDRO DE SOUZA THIAGO

TESE SUBMETIDA AO PROGRAMA DE CIÊNCIAS MORFOLÓGICAS
DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO VISANDO A
OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS.

Orientador: Prof. Dr. RADOVAN BOROJEVIC

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Instituto de Ciências Biomédicas
Departamento de Histologia e Embriologia
Abril, 2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



**UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO DE JANEIRO** UFRJ

**IDENTIFICAÇÃO DE POTENCIAIS ALVOS MOLECULARES E
NOVAS FERRAMENTAS TERAPÊUTICAS PARA A LEUCEMIA
LINFOBLÁSTICA AGUDA DE PRECURSORES B.**

LEANDRO DE SOUZA THIAGO

TESE SUBMETIDA AO PROGRAMA DE CIÊNCIAS MORFOLÓGICAS
DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO VISANDO A
OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS.

Orientador: Prof. Dr. RADOVAN BOROJEVIC

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Instituto de Ciências Biomédicas
Departamento de Histologia e Embriologia
Abril, 2008

IDENTIFICAÇÃO DE POTENCIAIS ALVOS MOLECULARES E NOVAS
FERRAMENTAS TERAPÊUTICAS PARA A LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA
DE PRECURSORES B.

Leandro de Souza Thiago

*Tese submetida ao Programa de Ciências Morfológicas da Universidade Federal
do Rio de Janeiro visando à obtenção do grau de Doutor em Ciências.*

Revisada e Aprovada por:

*Prof. Radovan Borojevic - Orientador
Professor do Depto. de Histologia e Embriologia
ICB-UFRJ*

*Profa. Marcia Cury El-Cheikh– Revisora e Suplente Interna
Professora do Depto. de Histologia e Embriologia
ICB-UFRJ*

*Profa. Vivian Mary Barral Dodd Rumjanek– Titular Externa
Professora do Instituto de Bioquímica Médica
UFRJ*

*Prof. Nelson Spector – Titular Externo
Professor da Faculdade de Medicina da UFRJ
UFRJ*

*Profa. Cláudia dos Santos Mermelstein –Titular Interna
Professora do Depto. de Histologia e Embriologia
ICB-UFRJ*

*Prof. Marcelo Gerardin Poirot Land –Suplente Externo
Professor da Faculdade de Medicina
UFRJ*

FICHA CATALOGRÁFICA

Thiago, Leandro de Souza

Identificação de potenciais alvos moleculares e novas ferramentas terapêuticas para a leucemia linfoblástica aguda de precursores B. Rio de Janeiro: UFRJ/Instituto de Ciências Biomédicas, 2008

XVI, 173p.

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Ciências Morfológicas

1. Via de Sinalização de Wnt 2. Leucemia 3. Apoptose 4. Proliferação 5. Resistência à Quimioterapia 6. Antiinflamatórios Não-Esteroidais 7. Etodolac

I. Universidade Federal do Rio de Janeiro II. Identificação de potenciais alvos moleculares e novas ferramentas terapêuticas para a leucemia linfoblástica aguda de precursores B.

*Aos meus pais, guerreiros
de uma árdua vida*

Agradecimentos

Aos meus pais, Paulo Roberto e Fátima Thiago, pela dedicação, pela paciência, e por todos os sacrifícios pessoais que me permitiram ver mais longe. O apoio de vocês foi fundamental para que essa conquista se realizasse.

À minha irmã, Bianca, pelo amor e carinho.

Ao prof, Radovan, por acreditar em mim e por sempre me apoiar. Seu incentivo e a inspiração despertada pela clareza de suas idéias nortearam meu processo de formação. Sou muito grato.

À Elaine Sobral, médica hematologista, pesquisadora e amiga, pela ajuda no trabalho experimental e pelas palavras de motivação. A energia positiva transmitida por ela foi peça essencial nesse trabalho.

Às médicas do Instituto de Puericultura e Pediatria da UFRJ, em especial à Alice, Ana Paula e mais uma vez, à Elaine, pelo fornecimento de amostras de pacientes e pela frutífera interação básico-clínica que desenvolvemos ao longo desse tempo. Uma interação que apenas se iniciou com essa tese.

À profa. Maria Isabel, pelos conselhos, ajudas durante todo o trabalho experimental e pelas muitas conversas agradáveis.

À Ivone Otazu, pesquisadora e amiga, pela ajuda no trabalho, pelos conselhos e por todo o carinho, traço marcante em sua personalidade. Mesmo à distância, sua amizade sempre se fez presente.

À Daiana Vieira, minha ex-aluna de IC, pela ajuda no trabalho experimental e pelo companheirismo.

À profa. Cláudia Mermelstein e Débora Portilho, pelo auxílio com a imunofluorescência.

Ao Alex Balduino, pelo fornecimento das células L e pelas muitas conversas sobre o mundo acadêmico.

À professora Márcia Cury, por todas as palavras de incentivo e motivação e também pela revisão dessa tese.

Ao Prof. José Garcia Abreu, pelas contribuições no trabalho, pelas palavras de incentivo nos momentos mais necessários e pelo carinho e amizade desenvolvidos ao longo desse tempo. Muito obrigado!

À todos do laboratório de Embriologia dos Vertebrados, em especial, ao Fábio Mendes e Débora Malta, pela ajuda no trabalho experimental e pela amizade. É um grupo extremamente unido, competente e formado por grandes pessoas. Aos poucos, tive o privilégio de fazer parte do dia-a-dia desse grupo e de compartilhar momentos especiais.

À Ana Paula Dantas, amiga de todas as horas, em todos os lugares. Obrigado por todo seu apoio, pelas alegrias e por compartilhar grandes momentos da vida. Muito obrigado!

À todos os colegas do BCRJ e do Transplante de Medula Óssea, pelo companheirismo ao longo dessa jornada.

À todos do laboratório do Centro de Pesquisas Oncohematológicas da Infância, na UNICAMP, em especial ao Alexandre Nowill e Gilberto Franchi, pelas contribuições no trabalho, pelo carinho e pela parceria estabelecida.

À todos meus amigos, que não cito os nomes para não cometer falhas. Todos vocês sabem o valor que dou a essa forma de amor. Vocês, que sempre estiveram presentes foram e são indispensáveis. O caminho foi muito mais leve com todos vocês. Muito obrigado!

Ao prof. Alberto Orfao, pela revisão final dos artigos.

Aos pacientes e seus responsáveis, os heróis anônimos desse trabalho, que contribuíram para o desenvolvimento dessa tese.

Ao Delmo, pelo preparo do material.

À Gorete e Edna, pelo carinho, apoio e pelas incontáveis ajudas.

À Capes, ao Programa Interinstitucional de Ensino, Pesquisa e Extensão em Biologia do Câncer– Instituto de Ciências Biomédicas, CNPQ e APABCAM, pelo apoio financeiro desse projeto.

À todos que esqueço o nome neste momento mas que contribuíram para tornar a vida mais fácil, construtiva e interessante.

Memento audere semper
(recorda-te de ousar sempre)

Gabriele D'Annunzio

Resumo

A identificação de novos alvos moleculares e de novas ferramentas terapêuticas é fundamental para aumentar as taxas de sobrevida e diminuir a recorrência da Leucemia Linfoblástica Aguda de Precursores B (LLA Prec.-B). A via de Wnt desempenha papel central no controle do destino celular, da proliferação, sobrevivência e migração de diversos tipos celulares. Em neoplasias hematológicas, vários autores têm relatado os efeitos da modulação da via de Wnt no comportamento das células tumorais. No entanto, no papel da via de Wnt na biologia das LLA Prec-B permanece controverso. Em paralelo, os antiinflamatórios não-esteroidais (NSAIDs) são potencialmente interessantes na oncologia, uma vez que diversos trabalhos mostram que a administração prolongada de NSAIDs reduz o risco de desenvolver determinados cânceres. Nosso objetivo foi avaliar o papel da via de Sinalização de Wnt na manutenção e na resistência as drogas de células de LLA Prec.-B e avaliar se o uso do NSAID Etodolac é citotóxico ou citoestático para as células leucêmicas. A análise de expressão gênica demonstrou que as células leucêmicas são potencialmente sensíveis a modulação da via de Wnt. A linhagem Nalm-6 é desprovida de β -catenina enquanto que Nalm-16 apresenta apenas distribuição membranar de β -catenina. A ativação canônica induziu morte celular de Nalm-16 enquanto que a inibição da via aumentou as taxas de sobrevivência celular. A ativação da via canônica aumentou a sensibilidade *in vitro* de Nalm-16 ao tratamento com VP-16 enquanto que os antagonistas da via induziram resistência à VP-16. Em paralelo, Etodolac induziu morte celular e reduziu a taxa de proliferação em ambas as linhagens testadas. Coletivamente, nossos resultados sugerem que a ativação canônica da via de Wnt exerce papel supressor de tumor enquanto que a inibição

da via promove a manutenção da sobrevivência das células leucêmicas. Desta forma, a ativação da via de Wnt pode representar um novo alvo terapêutico para induzir citoredução e aumentar a sensibilidade à quimioterapia de células de LLA de Prec.-B. Em adição, o uso de Etodolac pode representar um nova ferramenta terapêutica adjuvante para reduzir a massa tumoral nas leucemias de precursores B.

Abstract

The identification of new molecular targets and new therapeutic tools is essential to increase survival rates and to reduce relapse of B- cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia (BCP-ALL). The Wnt signaling pathway plays pivotal roles on cell fate decisions, proliferation, survival and migration of a variety of cell types. In hematological malignancies, many works have been related the involvement of Wnt pathway in the behavior of cancer cells. However, its role in BCP-ALL remains controversial. On the other hand, the nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs) are potentially useful in oncology, since several epidemiological studies have provided evidence that administration of nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs) reduce the risk of cancer onset. Our goal was to evaluate the role of the Wnt pathway in maintenance of BCP-ALL cells and resistance to chemotherapy. In addition, we attempted to evaluate the biological effect of Etodolac treatment on proliferation and cell survival in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL) cells. Gene expression profile revealed that BCP-ALL cells are potentially sensitive to modulation of Wnt pathway. Nalm-16 and Nalm-6 cell lines displayed low levels of canonical activation, as reflected by the virtually complete absence of total β -catenin in Nalm-6 and the β -catenin cell membrane distribution in Nalm-16 cell line. Canonical activation induced BCP-ALL cell death while Wnt pathway inhibition increased cell survival. Canonical activation enhanced the *in vitro* sensitivity of Nalm-16 to etoposide (VP-16). Conversely, treatment with canonical antagonists protected leukemic cells from chemotherapy-induced cell death. In addition, racemic Etodolac strongly induced cell death in both BCP-ALL cell lines and also

decreased cell proliferation in Nalm-16 BCP-ALL cell line. Collectively, our results suggest that canonical activation of the Wnt pathway exerts a tumor suppressive effect, thus its inhibition may support BCP-ALL cell survival. These results would support the development of novel targeted-therapies capable of inducing leukemic cell death, and enhancing response to chemotherapy in BCP-ALL. Also, we suggest that Etodolac might be efficient as an adjuvant therapy by reducing tumor bulk.

Lista de Abreviaturas

ADN	Ácido desoxiribonucleico
APC	Proteína do complexo de degradação de β -catenina (<i>adenomatous polyposis coli</i>)
ARN	Ácido ribonucléico
COX	Proteína ciclooxygenase
Dkk-1	Proteína do grupo de antagonistas de Wnt (<i>Dickkopf-1</i>)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DSH	Proteína <i>Dishevelled</i>
FAB	Grupo Franco-Americo-Britânico (<i>French-American-British</i>)
FZD	Proteína, receptor multipasso de Wnt (<i>Frizzled</i>)
GSK3-β	Proteína do complexo de degradação de β -catenina (<i>glycogen synthase kinase-3β</i>)
LEF	Proteína do grupo de fator de transcrição da via de β -catenina (<i>Lymphoid enhancer factor</i>)
LLA	Leucemia linfoblástica aguda
LLA Prec.B	Leucemia linfoblástica aguda de precursores B
LLC-B	Leucemia linfóide crônica de células B
LMA	Leucemia mielóide aguda
LMC	Leucemia mielóide crônica
LRP	Proteína co-receptor de Wnt (<i>Low-density lipoprotein receptor-related protein</i>)
MC	Meio condicionado
NS-398	Inibidor de COX-II
PI	Iodeto de Propídio
NSAIDs	Antiinflamatórios não-esteroidais
OMS	Organização mundial da saúde
PPAR	Proteína, receptor nuclear (<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i>)
SDX-308	Fármaco sintético análogo ao Etodolac
SFB	Soro fetal bovino
SFRP	Proteína; versão solúvel do receptor de Wnt (<i>Secreted frizzled-related protein</i>)
TCF	Proteína do grupo de fator de transcrição da via de β -catenina (<i>T cell factor</i>)
VP-16	Etoposídeo

ÍNDICE REMISSIVO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2	REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1	Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA)	5
2.2	Classificação das LLAs:.....	11
2.3	Via de Sinalização de WNT	15
2.4	Via de Sinalização de WNT nas Neoplasias.....	21
2.5	Apoptose, Necrose e Ciclo celular	24
2.6	Histórico e Princípios da Quimioterapia no Tratamento da LLA	28
2.7	Bases da Resistência à Quimioterapia.....	32
2.8	Antiinflamatórios Não-esteroidais como Nova Ferramenta Terapêutica Anti-tumoral.....	40
3	OBJETIVOS:.....	43
3.1	Geral	43
3.2	Específicos:	43
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
4.1	Linhagens Celulares Leucêmicas e Amostras de Pacientes	44
4.2	Separação Celular por Ficoll-Hypaque-Hystopaque	45
4.3	Isolamento de Células CD19 ⁺	46
4.4	Obtenção de Estroma de Medula Óssea	47
4.5	Ensaio de Microscopia de Imunofluorescência e Aquisição de Imagem Digital	48
4.6	Ensaio de <i>Western Blot</i>	49
4.7	Produção de Meio Condicionado de Wnt3a.....	51
4.8	Transfecção e Ensaio de Atividade da Luciferase	52
4.9	Modulação da Via de Wnt	53
4.10	Tratamento com Antiinflamatório Não-esteroidal	53
4.11	Ensaio de Apoptose.....	54
4.12	Análise de Ciclo Celular	54
4.13	Isolamento de Ácido Ribonucléico (ARN) Total.....	55
4.14	Síntese da Fita de ADN complementar (ADNc)	56
4.15	Reação em Cadeia da Polimerase-Transcriptase Reversa (RT-PCR).....	56
4.16	Análise Estatística	58
5	RESULTADOS	59
5.1	A linhagem Nalm-6 apresenta baixos níveis de β -catenina enquanto que a linhagem Nalm-16 expressa elevados níveis de β -catenina membranar e ausência da proteína no núcleo.....	59
5.2	Ativação da via canônica de Wnt induz morte celular na linhagem Nalm-16 enquanto que Wnt5a e Dkk-1 aumentam as taxas de sobrevivência dessa linhagem.....	61

5.3 A ativação da via canônica de Wnt aumenta a sensibilidade da linhagem Nalm-16 a quimioterapia enquanto que os inibidores da via canônica induzem resistência à VP-16	66
5.4 A modulação da via de Wnt não modifica as taxas de proliferação celular da linhagem Nalm-16	71
5.5 O perfil de Expressão Gênica das Células Leucêmicas de Precursores B corrobora com os achados funcionais relacionados à via de Wnt.....	73
5.6 Tratamento com Etodolac Racêmico induz morte celular nas linhagens Nalm-16 e Nalm-6 através de mecanismo independente de COX-II.....	75
5.7 Tratamento com Etodolac Racêmico reduz a proliferação da linhagem leucêmica Nalm-16 através de um mecanismo independente de COX-II.....	81
6 DISCUSSÃO	84
7 CONCLUSÕES	94
8 BIBLIOGRAFIA.....	96
ANEXO 1	117
ANEXO 2	120
ANEXO 3	123
ANEXO 4.....	157

1 INTRODUÇÃO GERAL

A leucemia linfoblástica aguda (LLA) é o câncer mais comum da infância correspondendo a 80% das leucemias da infância e cerca de 30% das malignidades até os 15 anos de idade, cujo pico de incidência nos países ocidentais é entre 3 e 5 anos. Cerca de 20 a 25% dos pacientes adequadamente tratados apresentam recidiva da doença (PUI, 1997). Portanto, a identificação de novos alvos moleculares e de novas ferramentas terapêuticas é fundamental para aumentar as taxas de sobrevida e diminuir a recorrência da doença.

A via de Wnt está envolvida com a mediação de comunicação celular durante o desenvolvimento embrionário e desempenha papel central no controle do destino celular, da proliferação, sobrevivência e migração de diversos tipos celulares na fase adulta, contribuindo para a manutenção da homeostasia e regeneração. A via de Wnt pode ser denominada canônica, quando envolve a ativação de β -catenina ou não-canônica, quando envolve outros mensageiros, como Ca^{++} ou JNK (c-jun NH(2) terminal Kinase) (KUHL, 2002).

A primeira evidência do envolvimento da via de Wnt no câncer surgiu a partir da identificação de Wnt-1, antes denominado Int-1, um gene ativado pela integração do vírus de tumor mamário murino (MMTV) em um modelo experimental de câncer mamário (NUSSE & VARMUS, 1982).

Em neoplasias hematológicas, vários autores têm relatado os efeitos da modulação da via de Wnt no comportamento das células tumorais. Nygren e colaboradores publicaram um trabalho mostrando que Wnt3a induzia a translocação de β -catenina para o núcleo e inibia a proliferação de várias, mas não todas, linhagens de LLA Prec.-B (NYGREN *et al*, 2007). As taxas de morte

celular não foram moduladas pelo tratamento com Wnt3a. Em 2007, outro grupo de pesquisadores mostrou que a ativação de células de LLA Prec.-B com Wnt3a induziu acúmulo de β -catenina nuclear e aumento da proliferação e sobrevivência celular (KHAN *et al*, 2007). Anteriormente, em 2004, um estudo amplo com amostras de biópsia de medula comparando os níveis de expressão de ARN mensageiro e de β -catenina em pacientes com desordens hematológicas (LMA, LLA, LMC e desordens mieloproliferativas sem cromossomo Philadelphia) revelou que os níveis do transcrito de β -catenina são mais elevados em LMA do que nas LLAs. Contudo, a análise da expressão da proteína indicou ausência de β -catenina nas células neoplásicas da LLA, sugerindo que a ativação da via canônica não desempenha papel central na LLA em contraposição com a LMA (SERINSOZ *et al*, 2004). Portanto, o papel da via de Wnt na biologia das LLAs permanece obscuro.

Dados recentes mas ainda escassos indicam que a ativação ou inibição da via de Wnt pode também modular a sensibilidade à quimioterapia de diversos tumores. Dependendo do modelo, essa modulação da via pode induzir efeitos positivos ou negativos na resistência às drogas.

Ohigashi e colaboradores mostraram que a inibição da via de Wnt através da superexpressão de WIF-1 em células de câncer de próstata aumenta a sensibilidade dessas células à Paclitaxel, e que esse fenômeno envolve a diminuição de atividade de Akt (OHIGASHI *et al*, 2005). Em contrapartida, células de osteosarcoma transfectadas com Dkk-3 não entram em apoptose e possuem resistência aumentada quando as células são privadas de soro ou quando são expostas a Cisplatina ou Doxorubicina (HOANG *et al*, 2004). De Toni e colaboradores mostraram em 2006 que a inibição da via de Wnt através da

incubação com Wnt5a, SFRP-1 ou Dkk-1 induziu resistência à Doxorubicina em células de LMA de forma tão intensa quanto a adesão celular à fibronectina. Apesar da β -catenina ter sido associada como um fator de sobrevivência em diversos trabalhos com células leucêmicas, esses autores mostraram que os níveis de β -catenina estavam muito baixos nos blastos resistentes tratados com antagonista de Wnt (DE TONI *et al*, 2006). Nenhum trabalho publicado até o momento relatou o papel da via de Wnt na resistência de células de LLA Prec.-B.

Dentre os fármacos já consagrados na prática clínica, os antiinflamatórios não-esteroidais (NSAIDs) são potencialmente interessantes na oncologia, uma vez que diversos trabalhos mostram uma estreita relação entre a administração prolongada de NSAIDs e a diminuição do risco de desenvolver determinados cânceres como o câncer colorretal (KUNE *et al*, 1988; ROSEMBERG *et al*, 1991), pulmão (SCHREINEMACHERS *et al*, 1994) e leucemia (KASUM *et al*, 2003). Dentre esses antiinflamatórios, encontra-se o Etodolac, usado no tratamento da osteoartrite, artrite reumatóide e no manejo da dor aguda por mais de vinte anos (VETTER *et al*, 1992). Etodolac é uma mistura racêmica de dois enantiômeros, R e S, cada um deles com propriedades farmacológicas distintas (DEMERSON *et al*, 1993). Os NSAIDs inibem a ação enzimática das ciclooxigenases (COX) (VANE, 1971), que cataliza a formação de prostaglandinas e tromboxano a partir do ácido araquidônico. A proteína COX-II é expressa em níveis elevados durante a inflamação e também em processos tumorais, como no câncer de cólon (JACOB *et al*, 1996; BOOLBOL *et al*, 1996), mama (DUBOIS *et al*, 1994a), pulmão (DUBOIS *et al*, 1994b; XIE *et al*, 1991), pâncreas (DUBOIS *et al*, 1994b) e mucosas de cabeça e pescoço (XIE *et al*, 1991; SHATTUCK-BRANDT *et al*, 2000; MARNETT, 1992).

Pesquisadores americanos usaram um inibidor análogo do etodolac, SDX-308 em células de mieloma múltiplo e observaram uma intensa diminuição da proliferação celular dos tumores (FENG *et al*, 2007). Recentemente, em dezembro de 2007, um grupo de pesquisadores alemães publicou um estudo de ensaio clínico de fase I utilizando R-Etodolac em pacientes com LLC-B. R-etodolac reduziu significativamente a contagem absoluta de linfócitos nos pacientes com LLC-B de forma dose dependente e induziu resposta parcial em dois pacientes num grupo de 43 envolvidos no estudo. Os autores sugerem que o R-etodolac é um potencial agente terapêutico de manutenção se incorporado aos protocolos correntes de tratamento (JENSEN *et al*, 2007).

Assim, tanto a modulação da via de Wnt quanto a administração de Etodolac pode ser de grande valia para a redução das taxas de recaída e conseqüente aumento das taxas de sobrevida dos pacientes de LLA Prec.-B.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA)

A leucemia linfoblástica aguda (LLA) constitui um grupo heterogêneo de doenças caracterizado por proliferação clonal de precursores linfóides B ou T acompanhado de bloqueio de diferenciação em determinado estado maturativo.

A LLA é o câncer mais comum da infância, com frequência de 1/25.000 indivíduos do grupo etário de 0 a 14 anos, correspondendo a 80% das leucemias da infância e cerca de 30% das malignidades até os 15 anos de idade. O pico de incidência nos países ocidentais é entre 3 e 5 anos. Cerca de 20 a 25% dos pacientes adequadamente tratados apresentam recidiva da doença (PUI, 1997).

As manifestações clínicas da doença são, em geral, reflexos de dois processos: a inibição da hematopoese pelas células leucêmicas e a disseminação destas células por diferentes órgãos e sistemas (VIANA, 1996). Essa inibição da hematopoese não é somente em decorrência da ocupação física da medula óssea e da competição por nutrientes entre células normais e neoplásicas. As leucemias subvertem o microambiente medular produzindo citocinas que induzem o bloqueio da hematopoese normal (VIANA, 1996). Apesar de comum entre as leucemias crônicas, mecanismos compensatórios de hematopoese extramedular são raros nas leucemias agudas. Em consequência, o quadro laboratorial comumente apresentado envolve anemia, neutropenia e plaquetopenia cuja apresentação clínica se dá pela palidez cutâneo-mucosa, infecções e hemorragia, respectivamente. A presença de febre pode refletir um processo infeccioso, que é a principal causa de morte desses pacientes, como também pode ser devido à produção de citocinas pelas células leucêmicas (RIBEIRO, 2004). Em termos

gerais, os sintomas apresentados são inespecíficos, não permitindo discernir entre outras doenças e nem diferenciar os diversos subtipos de leucemia.

A disseminação das células leucêmicas frequentemente leva a hepatomegalia, esplenomegalia e linfadenomegalia e pode ainda ocasionar dores ósseas e artralgia, devido à infiltração leucêmica do periósteo ou das articulações. A invasão do sistema nervoso central (SNC) pode causar vômitos, cefaléia, rigidez da nuca e até paralisia. Essa disseminação no SNC tem conseqüências prognósticas e terapêuticas importantes, uma vez que a barreira hematoencefálica protege as células leucêmicas da chegada da quimioterapia. Daí decorre que o SNC é um santuário para as células tumorais. A infiltração renal é freqüente em muitos casos mas geralmente não há conseqüências clínicas relevantes. A infiltração de coração e pulmão ocorre em todos os casos mas é clinicamente silenciosa (VIANA, 1996).

Apesar da etiologia da LLA permanecer obscura, a descoberta em 1997 por Gale e colaboradores de que as LLAs pediátricas já possuíam a translocação cromossomal MLL-AF4 na fase intra-uterina detectada nos cartões de Guthrie de recém-natos, trouxe nova compreensão para a história natural desta doença (GALE *et al*, 1997). Outros trabalhos publicados posteriormente demonstraram que outras translocações comumente encontradas ao diagnóstico também podiam ser detectadas no sangue ao nascimento, como a translocação TEL-AML1 (MORI *et al*, 2002). De fato, a chance de uma criança que seja gêmea univitelina desenvolver leucemia é 25% maior se o outro já tiver sido acometido pela doença (RIBEIRO, 2004). Apesar da maioria das LLAs sofrerem a primeira translocação durante a hematopoese fetal, há casos em que não foi possível detectar a translocação nas amostras de sangue, como nas leucemias pré-B com t(1;19) E2A-

PBX. Ainda, o aparecimento de translocações *in utero* parece ser um evento comum às leucemias de outros subtipos celulares. Um estudo com pacientes pediátricos de Leucemia Mielóide Aguda (LMA) demonstrou que 50% das amostras já possuíam a translocação TEL1-ETO nos cartões de Guthrie (WIEMELS *et al*, 2002). No entanto, outro grupo foi incapaz de detectar as translocações características das LMAs em todos os pacientes incluídos no estudo (n=13) (BURJANIVOVA *et al*, 2006). Esses casos negativos podem ser interpretados tanto como falso-negativos, por falhas na sensibilidade da técnica devido ao pequeno número de células portando a translocação na amostra, como também sendo um retrato da heterogeneidade das leucemias.

Ainda que alterações cromossômicas sejam importantes na iniciação da leucemia, sozinhas elas são insuficientes para gerar uma doença francamente estabelecida, o que sugere que mutações cooperativas são necessárias para a transformação oncogênica (MULLIGHAN *et al*, 2007). De fato, a variabilidade do período de latência da leucemia entre gêmeos idênticos que carregam a mesma translocação cromossômica e a observação de que o número de recém-nascidos que possuem translocações características sem a manifestação da doença excede o risco cumulativo de desenvolvimento de leucemias (MORI *et al*, 2002), indica a existência de um verdadeiro gargalo no processo de leucemogênese infantil, no qual o aparecimento de mutações somáticas secundárias pós-uterinas é essencial na deflagração da doença.

Algumas hipóteses de eventos secundários têm sido sugeridas a partir de estudos epidemiológicos. A correlação entre o elevado *status* sócio-econômico e o risco aumentado de incidência de LLA comum (LLAc) sugere que, pelo menos neste subtipo, infecções poderiam desempenhar um papel essencial no disparo dos

eventos leucemogênicos. Ainda, alguns autores sugerem que a ocorrência da LLA seja sazonal, sendo maior o número de casos no período outono-inverno (KARIMI & YARMOHAMMADI, 2003), o que corrobora com essa hipótese. No entanto, ainda há muitas controvérsias a respeito da ocorrência de sazonalidade das leucemias (GAO *et al*, 2005). De qualquer forma, essa hipótese sugere que a ausência de exposição a infecções comuns no primeiro ano de vida favorece uma resposta imunológica desregulada quando a exposição ocorre mais tardiamente. Desta forma, a LLAc seria uma resposta imunológica inapropriada e rara a infecções comuns.

Uma via alternativa levantada, que não é mutuamente exclusiva, é que as leucemias são respostas anormais a vírus capazes de transformar células. Apesar de alguns trabalhos epidemiológicos demonstrarem que ondas migratórias de populações para comunidades previamente isoladas foram capazes de aumentar a incidência de leucemias, como aconteceu em 1950 durante o desenvolvimento das novas cidades britânicas (KINLEN, 1988), nenhum agente etiológico foi detectado até o momento. Um estudo que promoveu uma varredura no genoma de pacientes com LLA não foi capaz de identificar a integração de herpesvirus de forma diferencial em pacientes em relação à população controle (MACKENZIE *et al*, 2001). Mesmo assim, outros agentes etiológicos virais ou bacterianos não podem ser descartados. Importante salientar que em qualquer das duas hipóteses citadas, a infecção em si é de baixa patogenicidade, o que sugere que fatores genéticos ou a suscetibilidade possuem papel importante no disparo de uma resposta anormal que culmina na leucemia francamente estabelecida. Congruente com essa idéia, Taylor e colaboradores demonstraram que o haplótipo HLA-DQA1-DQB1 influencia a suscetibilidade de meninos ao surgimento da LLA (TAYLOR *et al*, 1998).

A suscetibilidade ao desenvolvimento da LLA também está associada à síndromes genéticas associadas à instabilidade cromossômica, como nos casos de Síndrome de Bloom, Klinefelter, Noonan, Schwachmann-Diamond, neurofibromatose, Anemia de Fanconi e Ataxia-Telangectasia. A síndrome de Down também aumenta consideravelmente o risco de desenvolver leucemia, em especial a megacarioblástica, sendo o risco 20 vezes maior que o da população em geral. Outras anormalidades genéticas podem predispor a leucemia, como na síndrome de Li-Fraumeni, cujos indivíduos possuem mutações no gene p53 (RIBEIRO, 2004).

Ainda que a etiologia da LLA seja desconhecida, está muito claro que apenas uma fração pequena das células leucêmicas é capaz de manter a população tumoral através de sucessivas renovações. A noção de que apenas essa população rara de células da massa tumoral é capaz de induzir a expansão do tumor foi demonstrado pela primeira vez por Park e colaboradores utilizando células de mieloma múltiplo derivadas de ascite de camundongo. Apenas 1 em 10.000 até 1 em 100 células tumorais foram capazes de formar colônias *in vitro* (PARK *et al*, 1971). Essas células, denominadas coletivamente de células-tronco tumorais ou células iniciadoras de tumor, possuem as mesmas características definidoras das células-tronco normais, que são a capacidade de auto-renovação ilimitada, a baixa taxa de proliferação e a capacidade de gerar progenitores que seguem na diferenciação (PASSEGUÉ *et al*, 2003). Essas características peculiares garantem a manutenção do tumor indefinidamente, asseguram menor sensibilidade a quimioterapia e contribuem para a heterogeneidade tumoral ((SUTHERLAND *et al*, 1996). O grupo britânico liderado por Allison Blair caracterizou as células-tronco da LLA PREC.-B, mostrando que as células iniciadoras da leucemia são

CD34⁺/CD10⁻/CD19⁻. Esse trabalho sugere fortemente que são as células imaturas, ao contrário das células comprometidas com a linhagem linfóide, que são o alvo das mutações oncogênicas (COX *et al*, 2004).

A manutenção das células-tronco requer um nicho específico que preserve as características desse tipo celular. Isso implica imediatamente na importância do microambiente da medula óssea, que possui papel regulador central na progressão das leucemias. Células da medula óssea obtidas de pacientes com leucemia não conseguem se manter por mais de 48 horas em cultura na ausência de estroma de medula (MANABE *et al*, 1992). Ao contrário, a cultura mista com estroma permite que essas células se mantenham por longos períodos que chegam até a um ano, retendo as características imunofenotípicas e moleculares observadas ao diagnóstico (MANABE *et al*, 1992). Vale ressaltar, no entanto, que um grupo norueguês conseguiu em 2003 cultivar *in vitro* células de LLA Prec.-B em sistema independente de estroma, sendo que os pacientes selecionados eram todos com alta contagem de blastos no sangue periférico (BRUSERUD *et al*, 2003).

A maioria dos trabalhos que avaliaram a clonogenicidade das células de LLA Prec.-B em meios semi-sólidos após uma semana de cultura concluíram que em média apenas 0.28% das células da massa tumoral eram capazes de gerar colônias. No entanto, a análise clonogênica das células leucêmicas co-cultivadas com estroma de medula óssea mostrou que nesse modelo 15% das células em média eram capazes de produzir colônias, sugerindo que o estroma de medula é fundamental na manutenção da sobrevivência das células leucêmicas clonogênicas (NISHIGAKI *et al*, 1997). É interessante frisar que a incubação com meio condicionado produzido pelos mesmos estromas não é capaz de manter a viabilidade das células leucêmicas, sugerindo que adesão e/ou fatores

apresentados por sinalização juxtácrina são essenciais na manutenção dessas células (MANABE *et al*, 1994). As células estromais também possuem papel crítico na resistência à quimioterapia, e esse assunto será discutido na seção 2.7.

2.2 Classificação das LLAs:

Dependendo da linhagem celular acometida, as LLAs podem ser subdivididas em B ou T e possuem características biológicas, prognósticas e terapêuticas distintas. As leucemias bifenotípicas B/T são extremamente raras e de curso clínico nebuloso, tendo apenas dois casos publicados até o momento, um deles pelo nosso grupo (ANEXO 2).

O diagnóstico das LLAs é feito através das características morfológicas (Figura 1) e imunofenotípicas. A classificação morfológica proposta pelo grupo cooperativo Franco-Americano-Britânico (FAB) em 1976 e revisada em 1981 e 1996, discrimina três subgrupos (L1, L2 e L3), cujas características estão descritas na tabela 1. A caracterização do subtipo L3 é menos difícil do que a diferenciação dos subtipos L1 e L2. Com exceção da LLA-B de células maduras que se correlaciona com a morfologia L3, não existe uma clara relação entre a classificação morfológica proposta pela FAB e a classificação imunofenotípica (BAIN, 1993). Na revisão da classificação das neoplasias hematológicas feita pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em 1997, os subtipos L1 e L2 foram considerados indistinguíveis do ponto de vista biológico, clínico e prognóstico, diferindo apenas na morfologia. Desta forma, a distinção entre L1 e L2 não é fundamental para a definição da abordagem terapêutica utilizada. Em relação ao subtipo L3, há diferenças morfológicas, biológicas, clínicas e terapêuticas claras, sendo considerado uma contraparte leucêmica do Linfoma de Burkitt.

<i>Subtipo</i>	<i>Percentual de Casos (infantis)</i>	<i>Morfologia Característica</i>
L1	83-94%	Células blásticas pequenas e homogêneas, com alta relação núcleo-citoplasmática, bordos nucleares regulares, ausência de nucléolos, basofilia moderada e vacuolos não proeminentes
L2	5-15%	População celular heterogênea, células blásticas grandes e pleomórficas, proporção núcleo-citoplasma baixa, bordos nucleares irregulares, presença de nucléolos, basofilia moderada e vacuolos não proeminentes
L3	1-2%	População homogênea, blastos de tamanho intermediário, relação núcleo-citoplasmática variável, citoplasma basofílico, vacuolizado e presença de múltiplos nucléolos

Tabela 1: Classificação morfológica de LLA de acordo com o grupo

FAB.

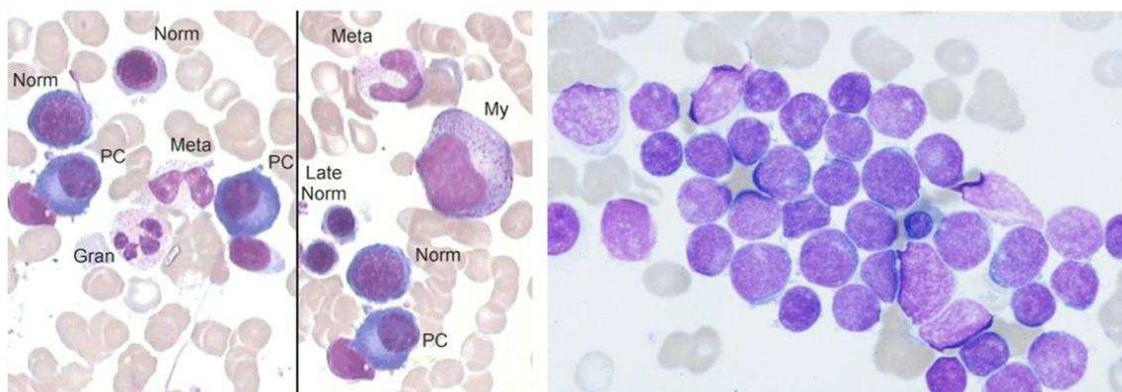


Figura 1: Aspirado de medula óssea humana normal (esquerda) X aspirado de medula óssea humana de LLA de precursores B (direita; subtipo L1, LLA Prec.-B comum). Norm (Normoblasto), Late Norm (*Late normoblast*, Normoblasto tardio), PC (*Plasma cell*, Plasmócito), Gran (Granulócito). Note a variedade de representação das linhagens hematopoéticas no aspirado normal e a quase totalidade de blastos linfóides leucêmicos no aspirado patológico. Coloração de May Grunwald Giemsa. Aumento original: 400X. Fonte: <http://www.hmds.org.uk/>

Antes do advento da tecnologia de citometria de fluxo, ferramenta valiosa na avaliação individualizada de múltiplas características celulares, a LLA era classificada em três subtipos imunológicos: LLA-T (baseada na capacidade de formar rosetas em contato com eritócitos de carneiros), LLA-B (baseada na expressão de imunoglobulinas de superfície) e LLA não B não T. Com o desenvolvimento de anticorpos monoclonais e da citometria de fluxo, a LLA passou a ser caracterizada em relação aos múltiplos estágios de diferenciação. Em 1986, quatro subclasses de leucemias de células B foram identificadas (FOON & TODD, 1986), a saber:

LLA de célula B precoce (HLA-DR⁺ CD19⁺)

LLA de célula Pré-B precoce (HLA-DR⁺ CD19⁺ CD10⁺)

LLA de célula Pré-B (HLA-DR⁺CD19⁺CD10⁺IgC⁺IgS⁻)

LLA de célula B madura (HLA-DR⁺ CD19⁺CD10⁺IgC⁺IgS⁺).

A atual classificação imunológica da LLA-B é mostrada na tabela 2 (BENÉ *et al*, 1999):

Tabela 2: Classificação Imunofenotípica atual para LLA-B

<i>Classificação da LLA</i>	<i>Marcadores</i>
Precursor jovem de LLA-B (LLA pró-B)	CD19, CD79a (cit), CD22, Tdt (nuc)
LLA comum	CD10
LLA Pré-B	cadeia μ (cit)
Burkitt leukemia	Tdt neg, cadeia pesada de Ig de superfície, cadeia leve κ / λ , CD10
LLA-B madura	slg

Cit=citoplasma; nuc = nuclear; Tdt = terminal deoxynucleotidyl transferase; Ig = imunoglobulina.

A classificação de leucemias bifenotípicas necessita que na mesma célula leucêmica sejam identificados marcadores de mais de uma linhagem, seguindo os critérios descritos na tabela 3.

Tabela 3: critérios para diagnóstico de Leucemia Aguda Bifenotípica

Leucemia Aguda Bifenotípica é caracterizada quando o escore é >2 para a linhagem mielóide e para uma das linhagens linfóides

Pontos	Marcadores B	Marcadores T	Marcadores Mielóides
2	CD79a IgM cit. CD22 cit.	CD3 cit. ou memb. Anti TCR α/β Anti TCR γ/δ	Anti MPO
1	CD19, CD10, CD20	CD2, CD5, CD8, CD10	CD13, CD33, CD65w
0	TdT, CD24	TdT, CD7, CD1a	CD14, CD15, CD64, CD117

2.3 Via de Sinalização de WNT

As proteínas Wnt compõem uma grande família de moléculas de sinalização extracelular altamente conservada encontrada ao longo de todo reino animal. Suas implicações numa vasta gama de eventos embrionários e em doenças humanas têm intensificado as investigações sobre essas proteínas e suas redes de sinalização ao longo das últimas duas décadas. A classificação dessas proteínas é definida pela homologia de seqüência de aminoácidos e não pelas propriedades funcionais. Desta forma, não é surpreendente a variabilidade de funções que essas moléculas podem exercer, dependendo do contexto em que se encontrem. Os membros de referência para essa classificação são os inicialmente descritos: Wnt-1 no camundongo, inicialmente conhecido por Int-1 (NUSSE & VARMUS, 1982; VAN OYEN & NUSSE, 1984) e Wingless (Wg; CABRERA *et al.*, 1987; RIJSEWIJK *et al.*, 1987) em *Drosophila Melanogaster*. O termo Wnt foi cunhado por uma combinação dos nomes dos dois genes.

Wnt é uma glicoproteína secretada rica em cisteína, que em geral contém cerca de 350-400 aminoácidos, e está envolvida com a mediação de comunicação celular durante o desenvolvimento embrionário e desempenha papel central no controle do destino celular, da proliferação, sobrevivência e migração de diversos tipos celulares na fase adulta, contribuindo para a manutenção da homeostasia e regeneração. A via de Wnt pode ser denominada canônica, quando envolve a ativação de β -catenina ou não-canônica, quando envolve outros mensageiros, como Ca^{++} ou JNK (c-jun NH(2) terminal Kinase) (KUHL, 2002). Uma pesquisa de 2007 dos componentes participantes ou associados à via de Wnt listou mais de 50 proteínas atuando nessa sinalização, evidenciando a complexidade dos estudos dessa via. A figura 2 mostra as principais proteínas envolvidas na via com seus

respectivos sítios de ligação.

O genoma dos vertebrados codifica cerca de dezenove tipos de fatores Wnt que, por sua vez, se ligam a uma família de receptores transmembranares do tipo serpentina chamada frizzled (Fzd). A interação das moléculas Wnt com seus receptores Fzd foi pela primeira vez descrita em 1996, quando células não-responsivas à Wnt de *Drosophila Melanogaster* foram transfectadas com moléculas Fzd e passaram a aumentar os níveis citoplasmáticos de Armadillo (BHANOT *et al*, 1996). Os receptores Frizzled possuem na porção amino-terminal um domínio rico em cisteína (CRD, do inglês) que é necessário para promover a interação Frizzled e proteínas Wnt. Da mesma forma, os receptores solúveis de Frizzled (SFRPs) possuem o domínio CRD e, portanto, competem com os receptores ancorados à membrana pela ligação às proteínas Wnt, servindo como importantes moduladores negativos da via.

A descoberta de que membros da família das proteínas unipasso relacionadas ao receptor de lipoproteína de baixa densidade (LRP) são também necessárias para a sinalização celular levantou a idéia de que Fzd e LRP funcionam como co-receptores da via de Wnt (TAMAI *et al*, 2000; WEHRLI *et al*, 2000). De fato, a ligação entre moléculas Wnt e LRP já foi observada, além da interação de moléculas Wnt e as formas solúveis de Fzd e LRP (TAMAI *et al*, 2000). Alguns autores sugerem que a interação entre Fzd e LRP seja suficiente para induzir sinalização na ausência de Wnt, sugerindo que o evento-chave da sinalização da via de Wnt é a aproximação física desses dois receptores (GORDON & NUSSE, 2006).

O principal efetor da via canônica é o fator de transcrição β -catenina, homólogo do gene Armadillo em moscas. Na ausência do ligante, a β -catenina

citoplasmática interage com o complexo de proteínas APC (Adenomatous polyposis coli) e Axina que servem de substrato para a atividade quinásica de GSK-3 β . A β -catenina fosforilada pela GSK-3 β é então ubiquitinada e destruída pelo proteasoma (GORDON & NUSSE, 2006).

Quando os ligantes Wnt estão interagindo com os receptores Fzd e LRP, o complexo de destruição APC/Axina/CK1/GSK3 β é inibido através da proteína intracelular Dsh (*Dishevelled*), levando a estabilização da β -catenina e sua conseqüente translocação para o núcleo, aonde ela interage com os membros da família de fatores de transcrição TCF (*T cell factor-1*) / LEF (*Lymphocyte enhancer factor-1*), ativando os genes-alvo de Wnt. No núcleo, a β -catenina diretamente substitui o repressor transcricional Groucho e as histonas deacetilases, que formam o complexo repressor e bloqueiam a transcrição gênica, e converte esse complexo em um ativador transcricional, disparando a produção de moléculas-alvo da via de Wnt (DANIELS & WEIS, 2005) (Figura 3).

Vale ressaltar que outras moléculas possuem papel essencial nos mecanismos de ativação transcricional, como Legless (Lgs), Pygopus (Pygo) e hyraz/parafibromina, um membro do complexo do fator associado à polimerase (PAF1). Toda essa complexidade da atividade de β -catenina nuclear contribuiu para o entendimento de uma das questões fundamentais dessa área, que é explicar como diferentes tipos celulares respondem de maneira tão diferenciada à mesma sinalização de Wnt, disparando transcrições gênicas diferenciais (GORDON & NUSSE, 2006).

A ativação da β -catenina nuclear também pode ser mediada pela via das Kinases-ligadas a Integrinas, cuja ativação promove translocação de β -catenina para o núcleo e transcrição gênica pela ligação ao promotor de LEF-1

(YOGANATHAN *et al*, 2000).

De forma antagônica, as moléculas de caderina são capazes de acumular β -catenina na porção interna da membrana citoplasmática, que interagem intimamente com o citoesqueleto e contribui na adesão homotípica. Desta forma, β -catenina é impedida de ser deslocada para o núcleo e de contribuir para a transcrição gênica. Estudos em linhagem de tumor coloretal evidenciaram que a expressão de E-caderina é capaz de suprimir a transformação celular através da inibição da sinalização nuclear de β -catenina, portanto, de forma independente da adesão *per si* (GOTTARDI *et al*, 2001).

A sinalização de Wnt também pode ser antagonizada por Dickkopf (DKK), uma família de proteínas capazes de se ligarem ao co-receptor de Fzd, LRP, e bloquear a ligação de LRP ao complexo funcional Fzd-Wnt. DKK-1, o mais extensivamente estudado membro da família Dkk, é um poderoso antagonista de Wnt. Em embriões de vertebrados, DKK-1 está envolvido na formação embrionária de cabeça, um fenômeno que envolve a inibição da via de Wnt (GLINKA *et al*, 1998).

A via não-canônica em *Drosophila* e vertebrados ainda é pouco compreendida. A característica fundamental é a independência da β -catenina para a regulação dos processos, tais como ocorre na gastrulação dos vertebrados. As vias não-canônicas foram denominadas de via Wnt/Cálcio e de Wnt/JNK em vertebrados. De forma breve, a ativação da via Wnt/Cálcio envolve a ligação de Wnt aos receptores Fzd, levando a liberação de cálcio intracelular e ativação de enzimas-dependentes de cálcio, como calmodulina quinase II (CamKII) e proteína quinase C (PKC). Essa ativação leva ao bloqueio da sinalização por β -catenina e a ativação do fator de transcrição sensível a cálcio, NFAT (nuclear factor of

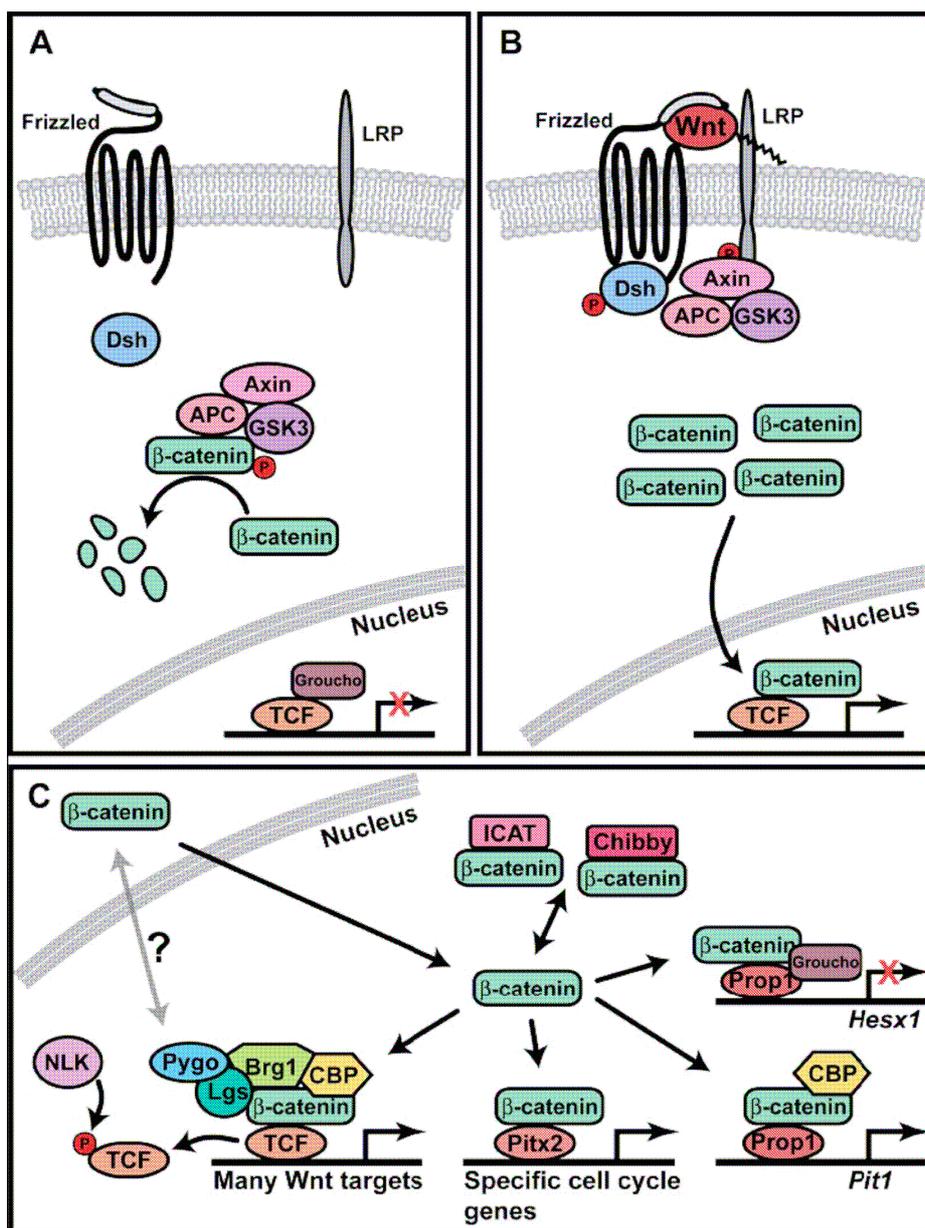


Figura 3: Modelo resumido da via canônica de Wnt. (A) Na ausência de sinal ativador, β -catenina é fosforilada e em seguida degradada, sendo assim TCF permanece bloqueado. (B) No momento que Wnt se liga ao complexo receptor, induz sinalização que leva a inibição de GSK-3 β , resultando em acúmulo de β -catenina não-fosforilada e sua translocação para o núcleo, que culmina na substituição do inibidor Groucho e ativação de TCF/LEF em cooperação com múltiplos fatores de transcrição para ativar a transcrição gênica (C) (GORDON & NUSSE, 2006).

2.4 Via de Sinalização de WNT nas Neoplasias

Organismos unicelulares crescem e se dividem limitados principalmente pela disponibilidade de nutrientes no ambiente, desde que as outras condições ambientais sejam favoráveis à sobrevivência. Ao contrário, o crescimento de células animais é governado por mecanismos que evoluíram para estabelecer e manter o tamanho ideal e as funções de órgãos interdependentes. Células tumorais subvertem as adaptações evolucionárias da multicelularidade e retomam o estilo de vida dos organismos limitados por nutrientes tão somente (HANAHAN & WEINBERG, 2000). Desta forma, compreender os mecanismos moleculares que governam o crescimento anômalo é fundamental para o desenvolvimento de novas terapias anti-tumorais.

A primeira evidência do envolvimento da via de Wnt no câncer surgiu a partir da identificação de Wnt-1, antes denominado Int-1, um gene ativado pela integração do vírus de tumor mamário murino (MMTV) em um modelo experimental de câncer mamário (NUSSE & VARMUS, 1982). Posteriormente, a proteína APC foi caracterizada como um gene supressor de tumor na polipose adenomatosa familiar, uma síndrome hereditária associada com alto risco de desenvolvimento de câncer coloretal e outros cânceres. Mutações de perda de função de APC induzem estabilização de β -catenina e transcrição gênica da via de Wnt. A maioria dos tumores esporádicos coloretais envolve ativação constitutiva da via de Wnt tanto pela perda de APC quanto por mutações que estabilizam a β -catenina (MORIN *et al*, 1997). Experimentos de inibição de β -catenina nuclear induziram diminuição de proliferação seguida de morte celular (SHIH *et al*, 2000). A análise da modulação epigenética de tumores coloretais mostrou a inativação

por metilação dos promotores dos genes de SFRPs e que a recuperação da atividade dessas moléculas diminui a formação de colônias e induz apoptose de células malignas (SUZUKI *et al*, 2004).

Em neoplasias hematológicas, vários autores têm relatado os efeitos da modulação da via de Wnt na biologia das células tumorais. As células B de pacientes com leucemia linfocítica crônica (LLC) expressam elevados níveis de diversos genes Wnt, bem como Fzd3, quando comparados com células B normais (LU *et al*, 2004). Ainda, a expressão de LEF-1 é acentuada nas células malignas da LLC-B enquanto que células de pacientes com linfoma não-Hodgkin de baixo grau apresentam baixos níveis ou até mesmo ausência de ARN mensageiro de LEF-1. A expressão de diversos membros da via de Wnt, como receptores Fzd e de co-receptores LRP pelas células de mieloma múltiplo e a ausência de expressão dessas moléculas, com a exceção de Fzd-3, em células de linfoma B sugere claramente diferenças entre as variadas malignidades de células B (LU *et al*, 2004).

A estimulação da via canônica com meio condicionado de Wnt3a ou tratamento com LiCl, que mimetiza os efeitos da via canônica através da inibição de GSK-3 β e conseqüente estabilização de β -catenina, promove aumento da taxa de proliferação celular em células de mieloma múltiplo (DERKSEN *et al*, 2004). De forma análoga, a ativação da via canônica com um inibidor farmacológico de GSK-3 β (SB-216763) em células de LLC-B induziu aumento de sobrevivência das células neoplásicas. Em 2002, pesquisadores americanos mostraram que a sinalização via β -catenina era fundamental para a regulação da proliferação, sobrevivência e adesão de células da linhagem Jurkat (LLA-T) (CHUNG *et al*, 2002). A inibição da via produziu bloqueio da proliferação e da clonogenicidade,

diminuição da adesão homotípica entre as próprias células Jurkat após estímulo com fitohemaglutinina e aumento da apoptose induzida por sinal externo (via Fas-L) (CHUNG *et al*; 2002). Nas leucêmicas mielóides crônicas em crise blástica, os progenitores de granulócitos e macrófagos expressam β -catenina em altos níveis e sua inibição pela transdução de Axina com lentivírus, reduziu a capacidade de auto-renovação das células leucêmicas *in vitro*.

Muitas controversas há a cerca do papel da via canônica de Wnt na LLA. Em células de leucemia pré-B que carregam a translocação E2A-PBX1, a proteína de fusão resultante ativou a expressão de Wnt16, possivelmente mediando efeitos autócrinos (MCWHIRTER *et al*, 1999). Em 2007, o grupo publicou um trabalho mostrando que Wnt3a induzia a translocação de β -catenina para o núcleo e inibia a proliferação de várias, mas não todas, linhagens de LLA Prec.-B (NYGREN *et al*, 2007). As taxas de sobrevivência celular não foram moduladas pelo tratamento com Wnt3a. Em 2007, outro grupo de pesquisadores mostrou que a ativação de células de LLA Prec.-B com Wnt3a induziu acúmulo de β -catenina nuclear e aumento da proliferação e sobrevivência celular (KHAN *et al*, 2007). Anteriormente, em 2004, um estudo amplo com amostras de biópsia de medula comparando os níveis de expressão de ARN mensageiro e de β -catenina em pacientes com desordens hematológicas (LMA, LLA, LMC e desordens mieloproliferativas sem cromossomo Philadelphia) revelou que os níveis do transcrito de β -catenina são mais elevados em LMA do que nas LLAs. Contudo, a análise da expressão da proteína indicou ausência de β -catenina nas células neoplásicas da LLA, sugerindo que a ativação da via canônica não desempenha papel central na LLA em contraposição com a LMA. Os autores sugerem, inclusive, que a análise dos níveis de β -catenina possa servir de ferramenta

diagnóstica para discriminar LMA de LLA (SERINSOZ *et al*, 2004). Congruente com essa idéia, em dezembro de 2007 foi publicado um trabalho mostrando que a deleção de β -catenina em células hematopoéticas de camundongos reduziu a capacidade de formação de LLC induzida por pela translocação cromossomal BCR-ABL (cromossomo *Philadelphia*) enquanto que facilitou a progressão da LLA induzida pela mesma translocação (ZHAO *et al*, 2007). Portanto, o papel da via de Wnt na biologia das LLAs permanece obscuro, necessitando de estudos adicionais.

2.5 Apoptose, Necrose e Ciclo celular

A homeostasia dos tecidos é regulada pelo delicado equilíbrio entre proliferação e morte celular, e descontroles de qualquer um dos processos pode contribuir para o surgimento e manutenção de tumores. Além do mais, o objetivo central da terapia anti-neoplásica é a indução de morte celular explorando as diferenças entre tecido normal e o tecido neoplásico. Essas diferenças estão intimamente relacionadas ao ciclo celular, como o tempo de duplicação e a fração de crescimento do tumor (HARKER *et al*, 1993).

A apoptose foi inicialmente reconhecida em 1972 por sua morfologia distinta da necrose e nomeada pela designação grega para “decadência” ou “queda”, a exemplo das folhas das árvores no outono (KERR *et al*, 1972).

A apoptose se caracteriza morfológicamente pela diminuição no tamanho celular, condensação da cromatina com posterior fragmentação nuclear e formação de corpos apoptóticos que mantêm a integridade de membrana, impedindo o extravazamento de proteínas e conseqüentemente evitando a inflamação (KUMAN *et al*, 2005). Da mesma forma, a integridade de membrana

impede a entrada de corantes como azul de Trypan e outras moléculas, como Iodeto de Propídeo.

As células apoptóticas geralmente exibem uma constelação distinta de modificações bioquímicas que são a base das alterações estruturais descritas previamente. Um aspecto característico da apoptose é a hidrólise das proteínas envolvendo a ativação de vários membros de uma família de cisteíno-proteases chamadas de caspases. As caspases ativadas clivam proteínas celulares vitais tais como laminas, destruindo a estrutura nuclear e o citoesqueleto (ISRAELS & ISRAELS, 1999). Além disso, as caspases levam a ativação de enzimas de degradação de ADN, chamadas de endonucleases. Os fragmentos da clivagem internucleossomal de ADN podem ser visualizados por eletroforese em gel de agarose, com a formação característica de múltiplas bandas de ADN. Em contraposição, um padrão “manchado” de fragmentação nuclear é indicativo de necrose (KUMAN *et al*, 2005).

Outra característica marcante da apoptose é a perda de assimetria de fosfolipídeos de membrana, devido a externalização de fosfatidilserina. Esse evento é crucial para o reconhecimento precoce das células apoptóticas pelos macrófagos, resultando na fagocitose sem a liberação dos conteúdos celulares que induzem a inflamação (PLATT *et al*, 1998). Esse fenômeno pode ser identificado por citometria de fluxo pela marcação com Anexina V, que se liga a fosfatidilserina (KOOPMAN *et al*, 1994). É importante salientar que, *in vitro*, as células apoptóticas sofrem no final do processo ruptura de membrana, o que é classicamente conhecido como apoptose secundária. Essa condição não acontece *in vivo* porque as células apoptóticas são fagocitadas antes pelos macrófagos residentes do tecido (GESKE *et al*, 2002).

A apoptose em malignidades hematológicas é iniciada por pelo menos duas vias de morte celular, a via mitocondrial e a via do receptor de morte (SCHIMMER *et al*, 2001). Ambas as vias convergem através da ativação de caspases terminais. A via mitocondrial é ativada através de p53 por uma variedade de estímulos, como em caso de dano ao ADN, enquanto que a via do receptor de morte é ativada pela ligação dos ligantes da família de TNF com seus respectivos receptores. Essas duas vias proximais são interconectadas em algumas situações através da ativação da molécula pró-apoptótica Bid. Evidências indicam que a maioria dos agentes anti-câncer ativam a via mitocondrial (KIM *et al*, 2002). O tratamento com Etoposide, por exemplo, ativa a proteína p53, resultando em despolarização mitocondrial e ativação de caspase-3 (KARPINICH *et al*, 2002).

O ciclo celular é um processo altamente hierarquizado e controlado no qual a informação genética é transmitida de uma geração à outra. Classicamente, o ciclo celular é dividido em fases: Células quiescentes estão em G0 (do inglês, *Gap*), as células sofrem influências dos fatores de crescimento e outros mitógenos na fase G1, que é maior fase do ciclo celular e é aonde ocorre uma intensa síntese proteica. Induzida pelos mitógenos, as células são impelidas a entrarem na fase S, de síntese de ácido desoxirribonucléico (ADN). A fase G2 é o intervalo entre a fase S e a mitose (fase M). Na mitose ocorre a formação do fuso mitótico, segregação da cromatina e divisão celular (ISRAELS & ISRAELS, 2001). O avanço gradual por essas fases é regulado por pontos de checagem molecular, que asseguram que todas as etapas anteriores foram realizadas com êxito, permitindo assim o avanço para a etapa subsequente. Essa checagem molecular é orquestrada pelas ciclinas e pelas quinases dependentes

de ciclinas (CDKs) e seus inibidores (CKIs) (GOLIAS *et al*, 2004). As CDKs conduzem ao ciclo celular por meio da fosforilação de proteínas-alvo críticas para a progressão das células para a próxima fase do ciclo celular (GOLIAS *et al*, 2004). Elas são expressas durante todas as fases do ciclo celular numa forma inativa e são ativadas depois de serem fosforiladas pelas ciclinas. As ciclinas são assim chamadas porque sofrem ciclos de síntese e degradação em cada ciclo da divisão celular.

Os genes responsáveis pela indução de proliferação são coletivamente chamados de protooncogenes enquanto que sua contraparte mutada, responsável pelo crescimento celular autônomo, é denominado de oncogene. Nesse grupo se encaixam as ciclinas, as quinases dependentes de ciclinas e diversas outras moléculas, como RAS e MYC. Em contrapartida, os genes responsáveis pelo bloqueio da proliferação celular são chamados de genes supressores de tumor e mutações nesses alvos também levam a descontroles de ciclo celular. Como exemplo clássico, podemos citar a proteína p53, comumente chamada de guardião do ADN, pelo seu papel de promover parada de ciclo celular quando há algum dano no ADN e tentar repará-lo (FISHER, 1994). Caso esse reparo não seja eficiente, a p53 ativa outras proteínas que induzem a apoptose da célula lesada, impedindo a expansão de células anômalas. Apesar da mutação na p53 ser a mutação somática mais comum em tumores, a incidência de mutações nesse gene em pacientes de LLA ao diagnóstico é baixa mas aumenta consideravelmente em células leucêmicas de pacientes em recaída (ZHU *et al*, 1999).

2.6 Histórico e Princípios da Quimioterapia no Tratamento da LLA

Paul Ehrlich observou a concentração de determinados corantes em alguns microorganismos e imaginou que esta especificidade poderia ter valor terapêutico caso fossem identificadas substâncias tóxicas para bactérias. O termo quimioterapia foi cunhado por ele no início do século XX na sua pesquisa por agentes curativos para a sífilis (EHRlich, 1907).

Em 1942, Louis Goodman e Alfred Gilman e colegas foram recrutados pelo Departamento de Defesa dos Estados Unidos para avaliar o potencial terapêutico de toxinas desenvolvidas para a guerra (CHABNER & JUNIOR-ROBERTS, 2005). Baseados em necropsias de soldados que haviam morrido na Primeira Guerra Mundial, Goodman e Gilman lançaram a hipótese de que a mostarda nitrogenada seria eficiente no tratamento de tumores do tecido linfóide, já que esses soldados apresentavam hipoplasia linfóide e mielosupressão. Após uma série de experimentos bem sucedidos em camundongos com tumores linfóides, eles convenceram seu colega Lindskog, cirurgião torácico, a injetar mostarda nitrogenada na corrente sanguínea de um paciente com linfoma não-Hodgkin (GILMAN, 1963). A massa tumoral linfática e do mediastino regrediram, no entanto, a remissão durou apenas algumas semanas. Ainda assim, a idéia de que drogas administradas sistemicamente poderiam induzir regressão tumoral foi pela primeira vez lançada (CHABNER & JUNIOR-ROBERTS, 2005).

A segunda abordagem terapêutica contra o câncer começou logo após a Segunda Guerra Mundial, quando Sydney Farber, patologista da *Harvard Medical School* e do *Children's Hospital* de Boston, investigava os efeitos do ácido fólico em pacientes com leucemia. Sua investigação demonstrou que essa vitamina

estimula a proliferação de células leucêmicas quando administradas a pacientes com câncer. A colaboração de Farber com Harriett Kilde e químicos do laboratório Lederle, levou a síntese de análogos de folato (primeiro, aminopterín e depois amethopterín – metotrexato). Esses análogos foram administrados a paciente com LLA no final dos anos 40 e levaram pela primeira vez os pacientes de LLA a remissão. Apesar de breve, essa remissão deixou claro que agentes antifolatos poderiam suprimir a proliferação de células malignas e reestabelecer a hematopoese normal (CHABNER & JUNIOR-ROBERTS, 2005).

Em seguida, na década de 50, corticosteróides e novas classes de quimioterápicos tornaram-se disponíveis e também induziram respostas parciais nestes pacientes. Na década de 60, vários grupos de investigadores, incluindo o grupo liderado por Pinkle, do *St. Jude Children's Research Hospital*, e grupos de estudo cooperativo como o *Children's Cancer Study Group A (CCG)*, e o *Pediatric Oncology Group (POG)*, desenvolveram o conceito de “terapia total”, que consiste no uso de combinações de drogas com diferentes mecanismos de ação, e demonstraram o sucesso do uso da poliquimioterapia na LLA. Na década de 70, além da introdução da profilaxia do SNC, tornou-se claro que diversas características clínicas e biológicas tinham implicação prognóstica, e buscou-se identificar subgrupos de pacientes com LLA com risco diferenciado de recidiva e morte relacionada à doença. Nos anos 80, foram introduzidas as fases de consolidação e intensificação do tratamento e o uso da combinação de múltiplos agentes quimioterápicos (KERSEY, 1997; RIVERA, *et al*, 1993; GREAVES, 1993). Desde então, com o avanço do tratamento da doença, a mortalidade por leucemia tem diminuído progressivamente (RIBEIRO, 2004).

Atualmente, pacientes tratados adequadamente com poliquimioterapia

apresentam 70 a 75% de sobrevida livre de eventos em cinco anos (KERSEY,1997; RIVERA, *et al*, 1993; GREAVES, 1993).

Essencialmente, o tratamento quimioterápico atua em algum evento essencial para a divisão celular. O alvo inicial destes agentes varia amplamente desde o ataque direto à molécula de ADN à inibição do fuso mitótico, necessário para que se complete a divisão celular. Conseqüentemente, a maioria dos agentes quimioterápicos interfere no comportamento celular induzindo a ativação dos mecanismos de reparo ou iniciando a apoptose, fenômeno central na ação da maioria dos agentes quimioterápicos (TABAK, 2004). Os agentes quimioterápicos podem ser classificados em três classes (BRUCE *et al*, 1966):

Classe I – agente não-específicos. Drogas que atuam de forma independente ao ciclo celular, atuando em células quiescentes (G0) e proliferativas (G1/S/G2/M).

Ex: agentes alquilantes e radiação gama.

Classe II – agentes fase-específicos: Drogas que atuam especificamente em alguma fase do ciclo celular.

Ex: metotrexato (antimetabólico análogo em estrutura ao ácido fólico, atuando na fase S); Vincristina (atua na fase M sobre a polimerização dos microtúbulos); Etoposide (VP-16), Daurorubicina e Daunorubicina, todos inibidores de ADN topoisomerase-II, atuando na fase S do ciclo).

Classe III – agentes ciclo-específicos. Atuação dependente de ciclo celular mas sem predileção por alguma fase específica.

Ex: 5-fluorouracil

A eficácia do tratamento quimioterápico depende não somente da classificação correta dos pacientes em grupos de risco, o que define os agentes a serem usados e a intensidade do tratamento, mas também de fatores como o desenvolvimento de resistência às drogas e fatores intrínsecos dos pacientes, como a farmacocinética das drogas antileucêmicas. De fato, há uma enorme variabilidade farmacocinética entre pacientes de LLA. Portanto, a recaída em alguns pacientes pode ser devido à exposição inadequada de quimioterápico e não aos fenômenos de resistência. A administração individualizada de metotrexato calculada pelos parâmetros farmacocinéticos de cada paciente é capaz de produzir melhores resultados clínicos (RUBNITZ & PUI, 2003).

Ainda assim, o fenômeno de resistência às drogas é determinante do sucesso da terapia e a compreensão das suas bases biológicas é fundamental para a melhoria da eficácia dos tratamentos e conseqüente aumento das taxas de sobrevida.

2.7 Bases da Resistência à Quimioterapia

Apesar da eficácia inicial demonstrada, os resultados terapêuticos obtidos com os primeiros agentes quimioterápicos desenvolvidos eram de curta duração e as recidivas frequentemente associavam-se ao aparecimento de células tumorais resistentes à terapia inicial. De fato, a resistência a um único agente terapêutico é um fenômeno freqüente mesmo em tumores responsivos. Com a implementação de protocolos terapêuticos com múltiplos agentes quimioterápicos, resultados clínicos superiores foram alcançados (TABAK, 2004). Esse sucesso se deve ao fato de que as populações celulares da massa tumoral são extremamente heterogêneas e, portanto, portam mutações distintas que geram fenótipos de resistência diferenciados.

O fenômeno de resistência às drogas pode ser intrínseco, se as células da população tumoral apresentam a maquinaria de resistência antes do tratamento, ou adquirido, após as sucessivas seleções de subpopulações com o tratamento quimioterápico. É importante salientar que a resistência à quimioterapia é uma manifestação intrínseca ao câncer. Mesmo em tumores altamente sensíveis ao tratamento, como leucemias e linfomas, as células neoplásicas frequentemente desenvolvem resistência durante o curso do tratamento enquanto que tecidos normais igualmente sensíveis, como a medula óssea e as mucosas, não só não se tornam resistentes à quimioterapia como podem na verdade se tornarem mais afetados durante o tratamento, eventualmente limitando as opções terapêuticas. Dessa forma, as mutações somáticas e a plasticidade genômica associadas ao câncer são as bases da resistência às drogas, seja ela adquirida ou intrínseca. Em tecidos normais, a resistência não surge porque a taxa de mutação é muito baixa

para permitir defeitos nos elementos genéticos que controlam a sensibilidade à quimioterapia (KRUH, 2003).

Em geral, tumores que são altamente sensíveis à quimioterapia são de crescimento rápido, não possuem estágios pré-malignos reconhecíveis e apresentam anormalidades cromossômicas simples. Em contraposição, tumores que surgem após longos períodos de estágio pré-maligno, como o câncer de pulmão e cólon, possuem mais tempo para adquirir mutações e são mais instáveis geneticamente e, portanto, tendem a ser mais intrinsecamente resistentes à quimioterapia (KNUDSON, 2001; KRUH, 2003).

A resistência pode se dar tanto pela inibição de entrada dos fármacos nas células, como acontece na perda de carreadores membranares para análogos de nucleosídeos (hENT1), antifolatos (RFC1) e cisplatina (CTR1) quanto por mecanismos que aumentem a extrusão das drogas, como acontece via os transportadores ABC (glicoproteína P, MRPs e ABCG2) e ATB7b, uma bomba que medeia a extrusão de cisplatina (KRUH, 2003). Em um estudo recente sobre o papel prognóstico das proteínas de múltipla resistência às drogas e de proteínas de apoptose em pacientes com LLA, mostrou que apesar de não ter havido nenhuma diferença significativa na taxa de sobrevida-livre de eventos em pacientes recém-diagnosticados, a presença dessas proteínas promoveu uma forte tendência de mau prognóstico nos pacientes em recaída (STYCZYNSKI *et al*, 2007). Estudos em linhagens celulares resistentes a quimioterapia mostram que os efeitos de resistência mediados pelas bombas de efluxo são particularmente mais relevantes em fármacos que se difundem passivamente pela membrana plasmática. Por outro lado, as células são mais predispostas a adquirir resistência à agentes que requerem carreadores membranares através da diminuição dessas proteínas do que

gerar resistência através dos mecanismos de bomba, que necessita que um grande gasto de energia (KRUH, 2003).

Dentro da célula, a atividade quimioterápica dos fármacos que necessitam de ativação prévia pode ser modulada pela perda de atividade de enzimas específicas envolvidas no metabolismo de ativação, como no caso do metabolismo de análogos de nucleosídeo (no caso do uso de Ara-C, por exemplo). Os alvos moleculares também podem ser modulados, tanto pela modificação dos níveis ou por mutações que as tornam menos sensíveis a inibição, como é o caso da camptotecina (ADN Topoisomerase I), epipodofilotoxinas (ADN Topoisomerase II), anti-folatos (dihidrofolato redutase), fluoropirimidinas (timidilato sintetase) e Mesilato de Imatinibi (BCR-ABL) (KRUH, 2003). Ainda, a redistribuição dos alvos das drogas desempenha papel importante na modulação da resistência, como acontece na redistribuição da ADN Topoisomerase II do núcleo para o citoplasma e conseqüente resistência aos seus inibidores (DALTON, 2003). Uma vez que o alvo molecular tenha sido atingido, fatores de resistência podem atenuar a capacidade da célula de sofrer apoptose como pela perda da proteína p53 e dos pontos de checagem do ciclo celular.

Outra classe de resistência envolve fatores que influenciam a habilidade de reparo de macromoléculas danificadas pela quimioterapia. Exemplos desse fenômeno incluem a perda de enzimas de reparo “mismatch”, que parecem conferir resistência à fluoropirimidinas ou inativação de MGMT, que confere sensibilidade aumentada a certos agentes alquilantes. A Tabela 4 resume os principais mecanismos clássicos de resistência das drogas mais utilizadas na prática clínica.

A adesão de células tumorais entre si também confere resistência às drogas

citotóxicas e radioterapia. Esse fenômeno é designado de resistência multicelular e foi demonstrado em células de câncer de mama que eram resistentes a agentes alquilantes mas que quando dissociadas e plaqueadas em culturas bidimensionais com crescimento em monocamadas, restauravam a sensibilidade à quimioterapia (RADL *et al*, 1988). Apesar desse efeito ser em parte, mediado por características físicas das culturas de esferóides, como a baixa difusão de oxigênio, nutrientes e drogas quimioterápicas, nesses modelos ocorre de fato a indução de expressão de genes associados a resistência, mostrando que não é um fenômeno indireto dos sistemas tridimensionais (DALTON, 2003).

O estroma da medula óssea também desempenha papel importante na resistência às drogas, através da produção de moléculas específicas e do contato célula-célula (IWAMOTO *et al*, 2007; MUDRY *et al*, 2000; KONOPLEVA *et al*, 2002). De fato, a medula óssea é o sítio de recaída mais freqüente em LLAs. MUDRY e colaboradores mostraram que clones leucêmicos que haviam perdido a dependência do estroma, retinham a habilidade de responder as interações celulares e o estroma era ainda capaz de proteger dos agentes quimioterápicos (MUDRY *et al*, 2000). Reconhecendo esse importante papel das células estromais na terapia anti-tumoral, sistemas de co-cultura com células de LLA e estromas têm sido usados como modelo para teste de drogas quimioterápicas. Tecidos peritumorais de outros cânceres também são capazes de modular a resposta às drogas. Em um estudo avaliando a resposta de células de carcinoma de colón a doxurubicina e 5-flurouracil, foram observados efeitos muito diferentes nas células tumorais de acordo com os sítios de metástase estudados (pulmão, fígado e baço) (FIDLER *et al*, 1994). Assim, cada microambiente específico governa diferencialmente as respostas à quimioterapia, tendo implicações clínicas

importantes no manejo dessas doenças.

A interação juxtácrina entre estroma e células leucêmicas é fundamental na indução de resistência, uma vez que o meio condicionado de estroma não é capaz de modular a resposta à quimioterapia com a mesma intensidade de quando há contato direto (GIBSON, 2002). Diversos fatores de sobrevivência produzidos pelo estroma têm sido descritos no contexto da resistência às drogas em LLA, como o SDF-1 (e seu receptor CXCR4) e VCAM-1 (e seu receptor VLA-4) (GIBSON, 2002). Em células leucêmicas, a produção de fatores de sobrevivência pelo estroma diminui consideravelmente a atividade de caspase 3 durante o tratamento quimioterápico (FORTNEY *et al*, 2001). Vale ressaltar que a exposição intensa do estroma a drogas quimioterápicas, pode também modificar o padrão de expressão dessas moléculas, deixando as células leucêmicas mais vulneráveis à quimioterapia. Essa modificação do microambiente pode explicar, por exemplo, a demora na recuperação hematopoética dos pacientes tratados com essas drogas, um dos principais efeitos colaterais do tratamento.

Dados recentes mas ainda escassos indicam que a ativação ou inibição da via de Wnt pode modular a sensibilidade à quimioterapia de diversos tumores. Dependendo do modelo, essa modulação da via pode induzir efeitos positivos ou negativos na resistência às drogas.

Ohigashi e colaboradores mostraram que a inibição da via de Wnt através da superexpressão de WIF-1 em células de câncer de próstata aumenta a sensibilidade dessas células à Paclitaxel, e que esse fenômeno envolve a diminuição de atividade de Akt (OHIGASHI *et al*, 2005). Da mesma forma, Shou e colaboradores mostraram em 2002 que células de glioblastoma multiforme são induzidas a superexpressar Dkk-1 após exposição a agentes alquilantes como Cisplatina e

Nitrosuréia (BCNU), à Adriamicina, que causa dano oxidativo, dimerização de Timina e quebra de fitas de ADN e à outros agentes genotóxicos como radiação UV e peróxido de hidrogênio (SHOU *et al*, 2002). A transfecção de uma linhagem de glioblastoma com baixos níveis endógenos de Dkk-1 com essa mesma molécula induziu maior sensibilidade à morte celular induzida por ceramida (SHOU *et al*, 2002), um lipídeo que é a unidade estrutural básica dos fosfolipídeos e que funciona como mensageiro secundário ativado em resposta à diversos estímulos como por exemplo, aos agentes quimioterápicos.

Em contrapartida, células de osteosarcoma transfectadas com Dkk-3 não entram em apoptose e possuem resistência aumentada quando as células são privadas de soro ou quando são expostas a Cisplatina ou Doxorubicina (HOANG *et al*, 2004). Outro grupo de investigadores mostra que células de câncer de mama negativas para receptores de estrogênio e progesterona, que cursam com prognóstico ruim, expressam preferencialmente Dkk-1 quando comparadas com os cânceres de mama positivos para esses receptores. Os autores sugerem que Dkk-1 seja um potencial marcador prognóstico e diagnóstico dos cânceres de mama de mau prognóstico (FORGET *et al*, 2007).

De Toni e colegas mostraram em 2006 que a inibição da via de Wnt através da incubação com Wnt5a, SFRP-1 ou Dkk-1 induziu resistência à Doxorubicina em células de LMA de forma tão intensa quanto a adesão celular à fibronectina (DE TONI *et al*, 2006). Apesar da β -catenina ter sido associada como um fator de sobrevivência em diversos trabalhos com células leucêmicas, esses autores mostraram que os níveis de β -catenina estavam muito baixos nos blastos resistentes tratados com antagonista de Wnt. No entanto, a inibição de GSK3 β aboliu a resistência à droga tanto induzida por adesão celular quanto pelos

inibidores de Wnt, sugerindo que GSK3 β seja o efetor desse fenômeno (DE TONI *et al*, 2006). De fato, essa enzima é o elo entre a sinalização de integrinas e da sinalização de moléculas da via de Wnt. O envolvimento de GSK3 β na sobrevivência celular é pouco descrito mas representa uma ferramenta terapêutica interessante uma vez que pode induzir sobrevivência ou resistência à apoptose dependendo do estresse ao qual a célula é submetida (ZANG *et al*, 2004). A ativação de GSK3 β leva a ativação de NF- κ B, promovendo a sobrevivência de células de LMA após a exposição à quimioterapia (DE TONI *et al*, 2006).

Portanto, compreender os múltiplos mecanismos envolvidos com a resistência à quimioterapia é fundamental para aumentar a resposta terapêutica e consequentemente o tempo de sobrevida dos pacientes.

Tabela 4: Mecanismos Clássicos de Resistência à quimioterapia

(Adaptado de HARKER *et al*, In: Wintrobe's Clinical Hematology).

<i>Mecanismo Geral</i>	<i>Exemplos</i>
Entrada da Droga prejudicada	Metotrexato, melphalan
Proteínas de Múltipla Resistência às Drogas	Doxorubicina, vincristina, actinomicina D, etoposide
Baixa ativação da droga	5- Fluorouracil, citosina arabinosídeo
Inativação acentuada da droga	Citosina arabinosídeo, agentes alquilantes
Amplificação Gênica	Metotrexato
Enzima-alvo modificada	Vincristina, metotrexato, hydroxureia, etoposide
Vias alternadas	Metotrexato, 5- fluorouracil
<i>Reparo de ADN acentuado</i>	Cisplatina, agentes alquilantes

2.8 Antiinflamatórios Não-esteroidais como Nova Ferramenta Terapêutica Anti-tumoral

A busca de novos fármacos menos agressivos e com efeitos citotóxicos e citoestáticos é essencial para a otimização do tratamento oncológico. Dentro dessa perspectiva, os antiinflamatórios não-esteroidais (*Nonsteroidal antiinflammatory drugs, NSAIDs*) possuem papel relevante.

Os NSAIDs constituem uma vasto grupo de fármacos com propriedades analgésicas, antipiréticas e antiinflamatórias (INSEL, 1990). Os membros mais conhecidos dessa família são a aspirina, ibuprofeno e naproxen. Muitos estudos epidemiológicos têm fornecido evidências de que a administração prolongada de NSAIDs possui efeitos profiláticos contra determinados cânceres como o câncer coloretal (KUNE *et al*, 1988; ROSEMBERG *et al*, 1991), pulmão (SCHREINEMACHERS *et al*, 1994) e leucemia (KASUM *et al*, 2003). Em pacientes com polipose adenomatosa familiar, o uso de NSAIDs como Sulindac e Indomethacina pode induzir regressão dos adenomas e esse efeito parece ser mediado pela indução de apoptose e bloqueio de ciclo celular (GIARDIELLO *et al*, 1993; HIROTA *et al*, 1996). Estudos em modelos animais também demonstram que esses fármacos podem suprimir a carcinogênese no cólon (RAO *et al*, 1995). Ainda, diversos estudos mostram que NSAIDs são capazes de induzir apoptose em células malignas (DING *et al*, 2004; VOGT *et al*, 2001).

Etodolac é um antiinflamatório não-esteroidal usado no tratamento da osteoartrite, artrite reumatóide e no manejo da dor aguda por mais de vinte anos (VETTER *et al*, 1982). Etodolac é uma mistura racêmica de dois enantiômeros, R e S, cada um deles com propriedades farmacológicas distintas (DEMERSON *et al*, 1983). Os NSAIDs inibem a ação enzimática das ciclooxigenases (COX) (VANE,

1971), que cataliza a formação de prostaglandinas e tromboxano a partir do ácido araquidônico que, por sua vez, é derivado dos fosfolipídeos de membrana através da clivagem de fosfolipase A2. COX é transcrita a partir de dois genes diferentes. As duas proteínas descritas são COX-I, constitutivamente expressa em todos os tecidos, e a COX-II, expressa em níveis elevados durante a inflamação e também em processos tumorais, como no câncer de cólon (JACOB *et al*, 1996; BOOLBOL *et al*, 1996), mama (DUBOIS *et al*, 1994a), pulmão (DUBOIS *et al*, 1994b; XIE *et al*, 1991), pâncreas (DUBOIS *et al*, 1994b) e mucosas de cabeça e pescoço (XIE *et al*, 1991; SHATTUCK-BRANDT *et al*, 2000; MARNETT, 1992).

Diversos grupos têm mostrado o potencial impacto terapêutico dos NSAIDs em doenças onco-hematológicas. Pesquisadores americanos usaram um inibidor análogo do etodolac, SDX-308 em células de mieloma múltiplo e observaram uma intensa diminuição da proliferação celular das células tumorais (FENG *et al*, 2007). Recentemente, em dezembro de 2007, um grupo de pesquisadores alemães publicou um estudo de ensaio clínico de fase I utilizando R-Etodolac em pacientes com LLC-B (JENSEN *et al*, 2007). O objetivo primário foi avaliar a tolerância, a segurança e a dose máxima tolerada nesses pacientes quando a droga era administrada duas vezes ao dia. Os objetivos secundários foram avaliar a resposta clínica, as atividades farmacodinâmicas (no caso, a redução dos linfócitos) e o perfil farmacocinético. Os efeitos colaterais foram em geral fracos e auto-limitantes, apresentando grau 3 e 4 de toxicidades gastrointestinal e 3 de toxicidades dérmica. R-etodolac reduziu significativamente a contagem absoluta de linfócitos nos pacientes com LLC-B de forma dose dependente e induziu resposta parcial em 2 num grupo de 43 pacientes envolvidos no estudo. Os autores sugerem que o R-etodolac é um potencial agente terapêutico de manutenção se

incorporado aos protocolos correntes de tratamento.

Diversos autores têm relatado que NSAIDs podem atuar por mecanismos independentes da enzima COX (TEGEDER *et al*, 2001). Isso é claramente demonstrado em estudos que mostram que NSAIDs são capazes de inibir crescimento de linhagens celulares de câncer de cólon que não expressão COX-II (SMITH *et al*, 2000). Um desses potenciais alvos é a família dos receptores nucleares ativados pelos proliferadores de peroxissomos (*peroxisome proliferators-activated receptor; PPAR*), que atuam como fatores de transcrição dependentes de ligantes. Três subtipos de PPAR foram identificados (α , β/δ , γ) e possuem distribuição variada entre os diferentes tecidos e estão associados com ligantes seletivos. Recentemente, um grupo de investigadores mostrou que PPAR γ está expresso em células de LLA Prec.-B e que o tratamento com ligantes de PPAR γ induz inibição do crescimento celular e apoptose (ZANG *et al*, 2004).

3 OBJETIVOS:

3.1 Geral

Esse trabalho tem como objetivo central identificar potenciais alvos moleculares e novas ferramentas terapêuticas para a Leucemia Linfoblástica Aguda de Precusores B.

3.2 Específicos:

1. Caracterizar o perfil de expressão protéica de β -catenina por *Western Blot* e sua distribuição celular por microscopia de imunofluorescência
 2. Avaliar os efeitos da modulação da via de Wnt na proliferação e sobrevivência das células leucêmicas, usando ativadores e inibidores específicos da via.
 3. Avaliar os efeitos da modulação da via de Wnt na resistência à morte induzida pelo quimioterápico Etoposide nas células leucêmicas, usando ativadores e inibidores específicos da via.
 4. Avaliar se GSK-3 β é capaz de modular a sobrevivência das células leucêmicas.
 5. Caracterizar o perfil de expressão de transcritos da via de Wnt/ β -catenina, dentre ativadores e inibidores.
 6. Avaliar os efeitos do tratamento com antiinflamatório não-esteroidal Etodolac na proliferação e sobrevivência das células leucêmicas.
 7. Avaliar os efeitos da inibição da via de COX-II na proliferação e sobrevivência das células leucêmicas.
-

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Linhagens Celulares Leucêmicas e Amostras de Pacientes

As linhagens celulares de LLA Prec-B, Nalm-16 e Nalm-6, foram originalmente estabelecidas do sangue periférico de pacientes em recaída. De acordo com o critério EGIL de classificação, Nalm-16 e Nalm-6 são caracterizadas como BII/ LLA Prec.-B comum (CALLA+) e BIII/ LLA Prec.-B de células pré-B, respectivamente (MATSUO & DREXLER, 1998).

As linhagens celulares foram mantidas em meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB; Cutilab, Campinas, SP, Brasil), 100 U/mL de penicilina sódica G, 100 µg/mL streptomicina, 2 mM L-glutamina, 1 mg/mL pirivato de sódio, 40 µM aminoácidos essenciais, e 40 µM aminoácidos não-essenciais (todos da Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, EUA). A densidade ótima de manutenção foi de 3×10^5 células/mL e 6×10^5 células/mL para a Nalm-16 e Nalm-6, respectivamente, com renovação integral do meio a cada 3 dias.

A linhagem Jurkat, representativa de LLA-T, foi obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro (Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil). A linhagem Jurkat foi mantida em meio Iscove's (Gibco-BRL) suplementado com 10% SFB, 100 U/mL penicilina e 100 mg/mL streptomicina. A densidade ótima de manutenção foi de 3×10^5 células/mL com renovação integral do meio a cada 3 dias.

A linhagem HEK 293T (*Human Embryonic Kidney cells*) foi mantida em meio DMEM suplementado com 10% SFB, 100 U/mL penicilina e 100 mg/mL streptomicina.

Em todos os casos, o pH foi ajustado para 7,2 com 1,5 g/L de bicarbonato de sódio e as células foram mantidas a 37⁰C em atmosfera úmida com 5% CO₂. A viabilidade das células foi monitorada pelo ensaio de exclusão de Azul de Trypan e as células quantificadas em câmara de Neubauer.

Células de medula óssea foram coletadas através de aspirado de medula óssea da crista ilíaca posterior de dois doadores de medula óssea de transplante alogênico e de cinco pacientes pediátricos com LLA Prec.-B (idade média 4,2 anos, faixa 2 meses- 8 anos).

Todas as amostras de pacientes foram coletadas após consentimento informado, após aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Instituto de Pediatria e Puericultura Martagão Gesteira (UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). A aprovação é apresentada no ANEXO 2.

4.2 Separação Celular por Ficoll-Hypaque-Hystopaque

As amostras foram inicialmente centrifugadas a 463g por 5 minutos, para a separação e descarte do plasma. A amostra restante foi diluída com PBS e homogeneizada. Todo o conteúdo das amostras diluídas foi cuidadosamente depositado em tubos Falcon de 15 mL contendo Ficoll-Hypaque na proporção de 1:3 mL de amostra diluída e centrifugados a 824g por 15 minutos a temperatura ambiente. Após a centrifugação, formou-se um anel na interfase do tubo, contendo as células mononucleares. Este anel foi cuidadosamente recolhido com pipeta Pasteur e transferido para um novo tubo e o volume foi completado com meio RPMI para um volume de 10 mL. O tubo foi homogeneizado e centrifugado por 5

minutos a 463g, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 2 mL de RPMI. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de exclusão de Azul de Trypan e as células quantificadas em câmara de Neubauer. As células mononucleares foram criopreservadas em nitrogênio líquido até o uso.

4.3 Isolamento de Células CD19⁺

Células B de pacientes com LLA Prec.-B foram purificadas a partir de células mononucleares usando o kit de Seleção Negativa de Células B da Dynal (Oslo, Noruega), seguindo as instruções do fabricante. Após a purificação das células mononucleares, as células foram lavadas 3x com PBS BSA 0,6% Citrato de Sódio e centrifugadas a 463g por 8 minutos a 4 °C. As células foram então ressuspensas em 200 µL de PBS 0,1 % BSA. Antes do início da seleção, as beads foram lavadas para retirar a azida que vem na solução. Brevemente, 100 µL de beads foram transferidos para um tubo, um campo magnético foi aplicado sobre o tubo com auxílio de um ímã por 1 minuto e a solução clara foi retirada enquanto os anticorpos permaneciam aderidos a parede do tubo devido a presença do ímã. Em seguida, o ímã foi retirado e acrescentado 2 mL de PBS 0,1% BSA e o procedimento repetido. Finalmente, as beads foram diluídas em 100 µL de PBS 0,1% BSA. Foram adicionados nessa solução contendo as células 20 µL de Mix de anticorpos (anticorpos linhagem-específicos contra linhagens não-B) e as células incubadas por 10 minutos na geladeira. Em seguida, as células foram lavadas com PBS 0,1% BSA e centrifugadas a 463g por 8 minutos. O sobrenadante foi então retirado e as células ressuspensas em 900 µL de PBS 0,1 % BSA. Em seguida, 100 µL de beads lavadas foram adicionadas às células e incubadas por 15 minutos na geladeira com rotação branda. Posteriormente, as células foram ressuspensas com

cautelosa pipetagem e adicionado 1 mL de PBS 0,1% BSA. O imã foi então posicionado no tubo e mantido por 2 minutos e o sobrenadante contendo as células B isoladas negativamente foi recolhido e transferido para outro tubo. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de exclusão de Azul de Trypan e as células quantificadas em câmara de Newbauer. A pureza da população selecionada foi avaliada por citometria de fluxo, através de marcação com CD19⁺. A pureza da população selecionada foi >98%.

4.4 Obtenção de Estroma de Medula Óssea

Células mononucleares de doadores de medula óssea foram plaqueadas na densidade de $1,5 \times 10^7$ células em meio Iscove's suplementado com 10% SFB, 100 U/mL penicilina sódica G e 100 µg/mL streptomicina. Semanalmente, metade do sobrenadante contendo células não-aderentes foi removida e substituída com meio fresco. Quando as monocamadas foram estabelecidas, as células foram dissociadas enzimaticamente com Tripsina 0,125% / EDTA 0,78 mM e plaqueadas nas mesmas condições. Uma vez que macrófagos são resistentes à tripsina, após duas etapas de replaqueamento foi obtida uma população aderente não-hematopoética, designada a seguir como "estroma". A viabilidade das células foi monitorada pelo ensaio de exclusão de Azul de Trypan e as células quantificadas em câmara de Newbauer.

4.5 Ensaio de Microscopia de Imunofluorescência e Aquisição de Imagem Digital

Para a microscopia de imunofluorescência, Nalm-16 foi submetida a citocentrifugação com 4×10^4 células nas lâminas de vidro desengorduradas e lavadas devidamente. As culturas foram rinsadas com Solução Salina Tamponada de Fosfato (PBS) e fixadas com 4% de paraformaldeído em PBS por 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, as células foram permeabilizadas com PBS/Triton X-100 0,5% por 3 vezes (10 minutos cada) à temperatura ambiente e sob agitação. As células foram então incubadas com o anticorpo primário policlonal anti- β -catenina (Sigma, C-2206), diluído 1:100 em PBS/Triton X-100 0,5% por 1 hora à 37°C. Após as incubações, as células foram lavadas com PBS/Triton X-100 0,5% por 3 vezes (10 minutos) e incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho marcado com FITC, diluído 1:100 em PBS/Triton X-100 0,5% por 1 hora à 37°C. Foram realizados experimentos controle somente com o anticorpo secundário (omitindo-se a incubação com o anticorpo primário). Após 3 lavagens com PBS/Triton X-100 0,5%, incubou-se as células com a sonda fluorescente DAPI à 0,1 $\mu\text{g/ml}$ em NaCl à 0,9% para revelação dos núcleos celulares. As células foram montadas com lamínulas de vidro, utilizando-se como solução de montagem: glicerol à 60 %, PPD à 0,0025%, N-Propil-Galato à 5% e DABCO à 0,25% pH 7.5. As células foram observadas em um microscópio óptico invertido Axiovert 100 (Carl Zeiss, Alemanha), com filtros seletivos apropriados para fluoresceína e UV (DAPI). As imagens foram adquiridas com um processador de imagens Argus 20 (Hamamatsu Photonics, Japão) acoplado a uma câmera CCD integrada (Hamamatsu Photonics, Japão), e transferidas através de uma interface SCSI a um computador Dell Optiplex GX270 computer (Dell Corporate,

EUA). As pranchas foram montadas utilizando o programa Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems Incorporated, EUA).

4.6 Ensaio de *Western Blot*

A análise de expressão da proteína β -catenina foi feita através de *Western Blot*. As células testadas foram primeiramente recolhidas das garrafas de cultura, lavadas 2x em PBS e centrifugadas a 463g por 5 minutos. $1,5 \times 10^7$ células foram lisadas com 100 μ l de tampão RIPA gelado (0,05M Tris-HCl pH 7,4, 0,15M NaCl, 1% NP-40, 0,25% deoxicolato de sódio, 2 mM EDTA, 1 mg/mL pepstatina, 1 mM PMSF, 1 mM NaF, 1 mM Na_3VO_4) para a extração de proteínas. A concentração de proteína no lisado celular foi determinado pelo método de Lowry e colaboradores (LOWRY *et al*, 1951). As amostras foram misturadas com tampão de amostra (0,02 mM ditioneitol (DTT); 1,38 mM dodecil sulfato de sódio (SDS); Tris-HCl 125 mM, pH 6,8 e 20% glicerol) e submetidas a eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida a 12% (SDS-PAGE). A preparação do gel envolve basicamente duas etapas: o gel de entrada da amostra e o gel de corrida. O gel de entrada da amostra consiste numa preparação feita a partir de 25mM de Tris/HCl, pH 6,8/ 0,15% de SDS/ 5% de acrilamida e 0,13% de bisacrilamida) e o gel de corrida feito com 0,4mM de Tris/HCl pH8.8/ 0,1% de SDS/ 12% de acrilamida e 0,13% de bisacrilamida. A corrida eletroforética foi realizada a 100V (aproximadamente 25mA) em tampão Tris-glicina (25mM Tris HCl/ 192mM de glicina/ 3,5mM de SDS) por aproximadamente 2h. Após a corrida, as proteínas foram transferidas por corrente elétrica para membrana de nitrocelulose (HybondTM-P, Amersham Biosciences, São Paulo, Brasil). O gel foi embebido em tampão de transferência (25mM de Tris/HCl/ 192mM de glicina/ 20% de metanol,

3,5mM de SDS) juntamente com a membrana de nitrocelulose. O gel foi colocado em contato com a membrana e a transferência semi-seca ocorreu por 1h e 30 min a 2mA por cm² de membrana. Após a transferência, a membrana foi incubada com a solução de bloqueio TBSt (20mM de Tris/HCl pH 7.6/ 137mM de NaCl com 0,1% de Tween 20), acrescidos de 5% de leite em pó desnatado, por 1h, lavada com TBSt por três vezes e incubada durante a noite a 4°C com o anticorpo policlonal primário para β -catenina (Sigma, diluição 1:2000). O anticorpo monoclonal anti-pan-actina (clone C4, Chemicon, Hofheim, Alemanha, diluição 1:2000) foi também empregado para comparar o carregamento do gel, após ser feita a retirada do anticorpo primário anti- β -catenina da membrana com 50 mL de NaOH 1M por 3 min. e a membrana ter sido em seguida lavada 5 vezes com TBST 1X por 5 min. Após a incubação com os anticorpos primários, a membrana foi lavada novamente três vezes com TBSt e incubada com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase ou com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase, de acordo com o anticorpo primário utilizado em cada momento (Promega, Madison, WI, EUA). Os anticorpos secundários foram utilizados na diluição de 1:2000 por 1h a temperatura ambiente. Após a incubação com o secundário, novas lavagens foram feitas com TBSt e por fim a membrana foi revelada através do método de intensificação da quimioluminescência pelo luminol (SuperSignal West Pico, Pierce, EUA). O método consiste na oxidação de luminol, reação catalisada pela peroxidase, em presença de peróxido de hidrogênio. Intensificadores químicos sustentam a emissão de luz do luminol que imprime as bandas correspondentes às proteínas imunodetectadas em filmes autoradiográficos (Kodak). Esses filmes foram então revelados e fixados com material específico Kodak. A análise de intensidade das bandas resultantes foi feita com o

software Image J (NIH) e os resultados foram expressos em unidades arbitrárias (AU).

4.7 Produção de Meio Condicionado de Wnt3a

Células L de camundongo transfectadas com Wnt3a (L-Wnt3a) e células L não transfectadas (L-controle) foram obtidas da American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, EUA) e cultivadas em meio Dulbecco's (DMEM; Sigma), suplementado com 10% FBS, 4 mM L-glutamina, 100 U/mL penicilina e 100 µg/mL streptomicina. Com o objetivo de selecionar as células satisfatoriamente transfectadas com os plasmídeos, a linhagem L-Wnt3a foi mantida em meio de cultura contendo 0,4 mg/ml G-418 (Gibco-BRL). Após 1 semana de expansão e seleção, as células foram lavadas 2X com PBS, dissociadas enzimaticamente com tripsina (tripsina 0,125% EDTA 0,78 mM) e replaqueadas para obtenção de meio condicionado de L-Wnt3a ou L-controle coletados de acordo com as instruções do ATCC. Brevemente, as células foram plaqueadas em diluição 1:10 em 10 mL de meio sem G-418 e mantidas por 4 dias para expansão. O meio de cada linhagem celular foi coletado e substituído por 10 mL de meio fresco e as células foram mantidas por mais três dias. A segunda bateria foi então coletada e as células descartadas. Ambas as baterias foram misturadas, filtradas esterilmente (0,2 µm) e armazenadas em -20°C até serem usadas. A atividade do meio condicionado foi testada pelo ensaio repórter de TCF/LEF associado à Luciferase como descrito a seguir.

4.8 Transfecção e Ensaio de Atividade da Luciferase

2×10^5 células HEK 293T (*Human Embryonic Kidney cells*) foram cultivadas em placas de 96 poços em meio DMEM contendo 10% SFB até atingirem 80% confluência. Nesse momento, foram transfectadas com plasmídeos de pGal (para a expressão de β -galactosidase), pFop-Flash (controle negativo do repórter com uma mutação no sítio de ligação de TCF/LEF) e pTop-Flash (repórter contendo o sítio de ligação normal de TCF/LEF), usando Lipofectamina 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). A mistura de ADN/Lipofectamina foi adicionada às células e mantida por 6 horas à 37°C. Após esse tempo, foi adicionado meio DMEM com 10% SFB e as células foram deixadas *overnight* para se recuperarem. No dia seguinte, as células foram incubadas por 18 horas com 10% de meio condicionado de células L-Wnt3a ou L-controle. Após o período de incubação, as células foram lisadas com tampão de lise RLB (*Reporter lysis buffer*, Promega, Madison, WI, USA). Após a lise das células, as amostras foram armazenadas a -70°C até o momento da leitura. Para o controle da transfecção, utilizamos a leitura em espectrofotômetro a 415 nm da atividade da β -galactosidase tendo como substrato 2-Nitrofenil β -D-galacto piranosídeo (ONPG) em solução contendo 50mM de Na_2HPO_4 , 10 mM de M KCL, 0,5M de MgCl_2 , 40 mM de NaHPO_4 , 1mg/mL de ONPG e 0,35 % de β -mercaptoetanol.

A atividade de Luciferase foi detectada com a adição de 100 μL de enzima-substrato luciferina de acordo com o protocolo do fabricante e 20 μL de amostras foram lidas no Luminômetro Tecan GÊNIO (Tecan Group Ltd., Mannedorf, Suíça). As emissões luminescentes foram medidas em um luminômetro. Para a normalização dos resultados, o índice de atividade de luciferase foi calculado dividindo os valores de luciferase pelos valores de β -galactosidase.

4.9 Modulação da Via de Wnt

A linhagem Nalm-16 foi plaqueada na densidade de 3×10^5 cells/mL em placas de 24 poços na presença ou ausência de 10^{-6} M etoposide (VP-16, Oncosídeo; Quiral Química SA, Juiz de Fora, MG, Brasil) e 10% de meio condicionado de L-controle ou L-Wnt3a, conforme indicado.

Para testar o efeito das proteínas purificadas na proliferação e sobrevivência celular, foram adicionados à cultura a proteína canônica Wnt3a, ou a proteína não-canônica Wnt5a ou os inibidores clássicos da via canônica (Dkk-1, SFRP-1), todos adquiridos da R&D Systems Minneapolis, MN, EUA e usados na concentração de 100ng/mL. Para investigar o potencial papel de GSK-3 β na sobrevivência da Nalm-16, foi adicionado a cultura Cloreto de Lítio (Sigma) na concentração de 3 ou 5 mM, conforme indicado.

4.10 Tratamento com Antiinflamatório Não-esteroidal

O antiinflamatório não-esteroidal Etodolac racêmico (Sigma-Aldrich) foi usado como modelo. A droga foi inicialmente dissolvida em dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich) e diluída em meio de cultura imediatamente antes do uso. As linhagens Nalm-16 e Nalm-6 foram plaqueadas na densidade de 3×10^5 células/mL em placas de 24 poços. As células foram tratadas com 100, 250 e 500 μ M de Etodolac e comparadas com as células-controle mantidas em DMSO, utilizando o mesmo volume que havia sido adicionado as culturas tratadas com Etodolac. Em paralelo, as linhagens celulares também foram tratadas com 10 μ M de NS-398 (Biomol, Plymouth Meeting, PA, EUA), um inibidor específico da enzima COX-II e a proliferação e sobrevivência analisadas como descritas a

seguir.

4.11 Ensaio de Apoptose

Após 24, 48 e 72 horas de cultura, as células foram coletadas e distribuídas em tubos Falcon de 15 mL, lavadas 2X com PBS e a viabilidade foi medida por ensaio de exclusão de Azul de Trypan. Foi feita dupla marcação com Anexina V-FITC (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) para células apoptóticas e Iodeto de Propídio (PI; Sigma) para células em necrose foi feito de acordo com instruções dos fabricantes. Brevemente, cerca de 1×10^6 células em 100 μ L de tampão de Anexina V (10 mM HEPES, 140 mM NaCl e 2.5 mM CaCl_2 , pH 7.4) foram transferidas para um tubo de FACS. Em seguida, 5 μ L de Anexina V diluída 1:10 foi adicionado e as células incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente protegidas da luz. Em seguida, as células foram ressuspensas em 400 μ L de tampão de Anexina e marcadas com PI (0,0005 μ g/mL) imediatamente antes da aquisição. As amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo FACSCalibur (BDB, San José, CA, USA) em plataforma Machintosh, utilizando-se os canais FL1 (verde) para Anexina V e FL2 (vermelho) para PI, sendo coletado um total de 30.000 eventos.

4.12 Análise de Ciclo Celular

O conteúdo de ADN foi monitorado por citometria de fluxo após marcação com PI de acordo com o protocolo de Vindelov e colaboradores (VINDELOV *et al*, 1983) em 24, 48 e 72 horas. Brevemente, em tubos de citometria, cerca de 1×10^6 células foram centrifugadas a 400xg a 15 °C. Sobre o pellet foi adicionado

1 mL de CCPIS (*Cell Propidium Iodide Solution*), composta de 50 µg/mL de Iodeto de Propídio, 100 U/mL de RNase A em PBS 1X (pH 7,4). As células foram então vortexadas e a aquisição feita imediatamente após a adição da solução usando o canal FL3 (vermelho) do aparelho de FACS. Células com conteúdo subdiploide, apresentando pico em sub-G0 foram excluídas da análise de ciclo celular. Um total de 10.000 eventos foi adquirido na *gate* de células viáveis. Os dados de FACS foram analisados usando o software Infinicyt (Cytognos, Salamanca, Espanha).

4.13 Isolamento de Ácido Ribonucléico (ARN) Total

Cerca de 5×10^6 células (CD19⁺ de pacientes, linhagens celulares ou estroma de medula óssea) foram recolhidas, lavadas 2x com PBS e adicionadas a 1 mL de solução de Trizol. As amostras foram homogeneizadas bem para desfazer os complexos nucleoproteicos. As amostras foram congeladas a -20 °C até seu uso. Ao descongelar, as amostras foram mantidas em repouso por 10 minutos a temperatura ambiente, e em seguida foi adicionado 0,2 mL de Clorofórmio (Merck) para cada 1 mL de Trizol. Os tubos foram agitados por 15 segundos e incubados por 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 16024 g por 15 minutos a 4 °C. A fase aquosa foi então retirada, recolhendo-se aproximadamente 500 µL dessa fase. Em seguida, foi acrescentado 500 µL de álcool isopropílico (Merck) à fase aquosa, os tubos homogeneizados e incubados por 10 min. a temperatura ambiente . Os tubos foram então centrifugados a 16024 g por 10 min sem refrigeração. O sobrenadante foi retirado e adicionado 1 mL de etanol 75% diluído em água com dietilpirocarbonato

(DEPC) , as amostras foram vortexadas e centrifugadas a 5232 g por 5 min. O sobrenadante foi retirado com cuidado e o *pellet* foi deixado por 15 min. para evaporar o álcool. Após esse período, a ARN total foi diluído em 10 µL de água DEPC e estocado à -20 °C. Antes da síntese de ADN, o ARN foi quantificado por espectrofotometria a 260 nm.

4.14 Síntese da Fita de ADN complementar (ADNc)

A síntese de ADNc foi realizada a partir de 2 µg da amostra de ARN total. Primeiramente, o ARN foi desnaturado a 65°C por 10 minutos e transferido rapidamente para o gelo após esse procedimento. Em seguida, a fita de ADNc foi sintetizada adicionando à solução de ARN, 1 µL de *primer* oligo-DT (500 ug/mL, Invitrogen) e 1 µL da enzima MMLV-TR 200 U/mL (*Moloney murine leukemia virus – transcriptase reversa*, Invitrogen), 0,01M de DTT, 0,5mM de cada dNTP (Invitrogen), tampão da enzima (Invitrogen) e H₂O DEPC q.s.p. O volume final da reação era de 20 µL e a síntese da fita foi feita durante 2 horas a 39°C. Após este período a reação foi interrompida através da incubação das amostras por 10 minutos a 90°C.

4.15 Reação em Cadeia da Polimerase-Transcriptase Reversa (RT-PCR)

Para comprovar a integridade das amostras de ADNc, foi realizada a RT-PCR para amplificação do gene GAPDH, cuja expressão é constitutiva e ubíqua sendo considerado portanto um gene *housekeeping*. Após confirmada a eficiência de transcrição, as amostras foram testadas para os genes de interesse deste trabalho. Para todos os genes, a reação foi padronizada da mesma forma, mudando-se apenas os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados. A tabela

5 apresenta a seqüência de *primers*, a temperatura de anelamento e o tamanho do produto amplificado. Foram adicionados em cada tubo de PCR, 0.05 U/ μ L da enzima TAQ-polimerase (Cembiot^{Enzimas}), 20 μ L de Mix de PCR e 2 μ L de ADNc. A reação em cadeia da Polimerase foi feita na termociclador TGradient (Biometra, Göttingen, Alemanha). A reação foi feita em 5 (cinco) passos: (1) desnaturação inicial a 96°C por 1 minuto (2) 34 ciclos de desnaturação a 96°C por 30 segundos, (3) anelamento a Temperatura Ideal (TM) por 45 segundos, (4) e extensão a 72 °C por 1 minuto, (5) extensão final a 72°C por 5 minutos. Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% (Invitrogen) diluída em TAE, corado com brometo de etídeo 0,17 μ g/mL (Amersham Biosciences) diluído em TAE e visualizado em transiluminador.

Tabela 5: Oligonucleotídeos Iniciadores (*Primers*) usados na detecção dos membros da via de Wnt

<i>Primer</i>	Senso (5'– 3')	Anti-senso (5'-3')	Tm	Tamanho do Produto Amplificado
Wnt5a	TTTTTCTCCTTCGCCAGGTT GT	GGTCATGGCGTTCACCA C	57.5	358 pb
Wnt3a	CTTTGCAGTGACACGCTCAT	GTGCTTCTCCACCACCAT CT	63	234 pb
Fzd-3	GCTGTACTCACAGTTAACAT G	GCTAAAATACCCTTGCTG ATT	56	455 pb
LEF-1	CCAGCTATTGTAACACCTCA	TTCAGATGTAGGCAGCT GTC	57.5	420 pb
Dkk-1	TGGTCCAAGATCTGTAAACC TGTC	CTGGCTTGATGGTGATCT TTCTGTA	67.5	149 pb
SFRP-1	CCAGTTTGCATTTGGATGTG	GGTCAGAACGGCCAGTA TGT	57.5	187 pb
SFRP-2	GCCTCGATGACCTAGACGAG	GATGCAAAGGTCGTTGT CCT	57.5	152 pb
GAPDH	ATCACCATCTTCGAGGAGCG	CCTGCTTACCACCTTCT TG	57.5	571 pb

4.16 Análise Estatística

A significância estatística foi determinada usando o teste T não-pareado e o teste não-paramétrico Mann-Whitney (Prism 2.01 software; GraphPad, San Diego, CA, USA), conforme indicado. Resultados com $P < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5 RESULTADOS

5.1 A linhagem Nalm-6 apresenta baixos níveis de β -catenina enquanto que a linhagem Nalm-16 expressa elevados níveis de β -catenina membranar e ausência da proteína no núcleo.

Tendo em vista que a β -catenina é a molécula central na ativação canônica da via de Wnt, nosso primeiro objetivo foi avaliar a expressão e distribuição da β -catenina nas linhagens de LLA prec.-B.

Ensaio de *Western Blot* mostraram que a linhagem Nalm-6 apresenta níveis extremamente baixos da proteína β -catenina enquanto que a linhagem Nalm-16 apresentou elevados níveis dessa proteína, compatível com os níveis encontrados na linhagem Jurkat, na qual essa molécula é sabidamente importante na manutenção da sobrevivência. A figura 4D apresenta um gel representativo do ensaio de *Western Blot* e a figura 4E apresenta o gráfico dos níveis de expressão de β -catenina em dois experimentos independentes.

No entanto, a presença da β -catenina *per se* não indica se essa proteína está no núcleo ou na membrana, aonde exercem papéis muito diferentes. A marcação por imunofluorescência revelou que na linhagem Nalm-16, a β -catenina encontra-se basicamente confinada ao complexo de adesões celulares membranares. A figura 4A apresenta a marcação para β -catenina, a figura 4B a marcação nuclear com DAPI e a figura 4C apresenta a sobreposição de ambas as imagens.

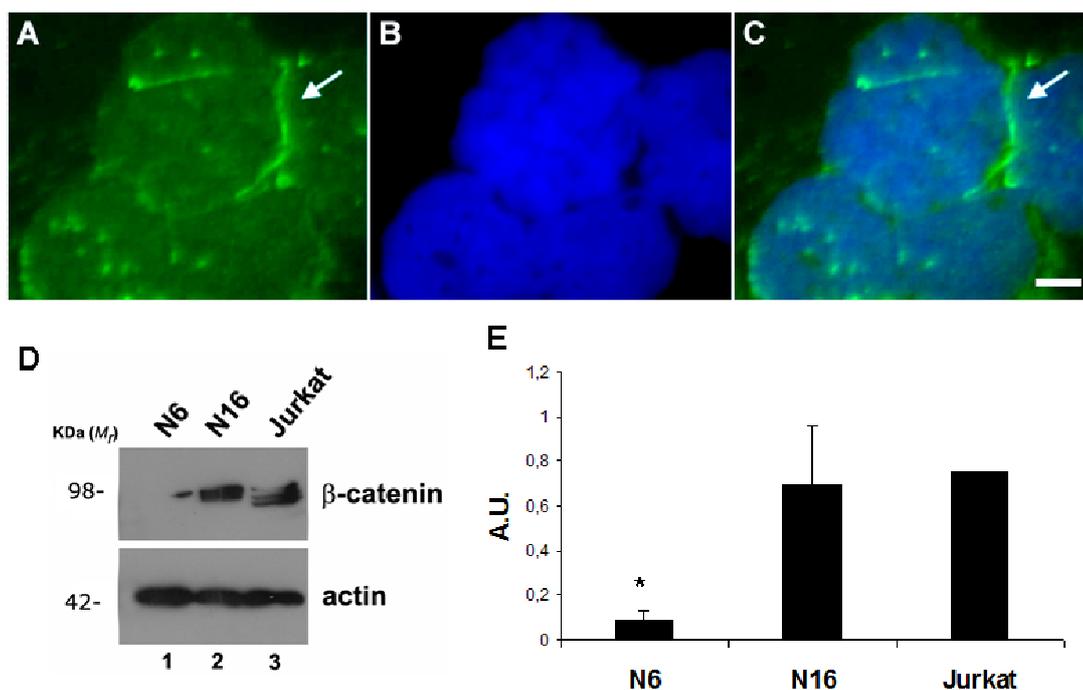


Figura 4: Perfil de Expressão de β -catenina Total nas Linhagens de LLA Prec. B. Microscopia de imunofluorescência para β -catenina total (A), DAPI (B) e imagens sobrepostas (C) na linhagem Nalm-16. (Barra = 5 μ m). Como mostrado, grande parte da expressão de β catenina está localizada na membrana celular (setas). A Análise de *Western Blot* para β -catenina total mostrou que a linhagem Nalm-6 (N6), ao contrário da Nalm-16 (N16), é virtualmente desprovida dessa proteína (D). Para esses experimentos, a linhagem Jurkat foi usada como controle positivo. Os níveis de β -catenina total (média \pm desvio-padrão) de dois experimentos independentes (expresso em unidades arbitrárias; A.U.) são mostrados no painel E (* $p < 0.0001$ - N6 versus N16).

5.2 Ativação da via canônica de Wnt induz morte celular na linhagem Nalm-16 enquanto que Wnt5a e Dkk-1 aumentam as taxas de sobrevivência dessa linhagem

Com o intuito de investigar o papel da ativação da via canônica de Wnt na sobrevivência das células de LLA Prec. B, a linhagem celular Nalm-16 foi tratada tanto com o ativador canônico Wnt3a quanto com os inibidores dessa via (Wnt5a, Dkk-1 e SFRP-1). Em todos os casos, a concentração de uso das proteínas recombinantes purificadas foi de 100 ng/mL. O número de células totais foi determinado por ensaio de exclusão de Azul de Trypan e a análise de apoptose foi feita por citometria de fluxo utilizando os marcados Anexina V e PI.

A figura 5A apresenta o índice de variação de viabilidade, obtido a partir do número de células Anexina-V⁻/PI⁻ totais. O valor da mediana das células sem tratamento (controle) é 1, usado como referência para calcular os outros valores das células tratadas com os moduladores da via. A figura 5B apresenta o perfil de apoptose por citometria de fluxo. Como observado nessas figuras, a incubação com o agonista Wnt3a claramente induziu morte celular na linhagem Nalm-16, diminuindo em até 50% a população viável em 48 horas. Por outro lado, a incubação com Wnt5a ou Dkk-1 foi capaz de aumentar as taxas de sobrevivência da Nalm-16 em relação ao controle.

Apesar de SFRP-1 na concentração testada ter mostrado uma pequena tendência de aumento da taxa de sobrevivência, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada (Figura 5 A e B).

Após a ativação canônica de Wnt, GSK3 β é inibida através da proteína intracelular Dsh (*Dishevelled*), levando a estabilização da β -catenina e sua conseqüente translocação para o núcleo, aonde ela interage com os membros da família de fatores de transcrição TCF (*T cell factor-1*) / LEF (*Lymphocyte*

enhancer factor-1), ativando os genes-alvo de Wnt. Desta forma, decidimos investigar se a inibição da enzima GSK-3 β induz atividade citotóxica semelhante ao tratamento com Wnt3a. A inibição da enzima foi feita com LiCl, na concentração de 3 ou 5 mM. A figura 6 apresenta os dados dessa inibição, realizada com 10% de SFB (6A e 6B) ou com 1% de SFB (6C e 6D). Esse tratamento claramente diminuiu a sobrevivência celular em todos os casos testados, sustentando a idéia que a atividade de GSK-3 β é importante para modular a sobrevivência das células leucêmicas de precursores B. Vale ressaltar que a morte celular foi mais pronunciada na menor concentração de SFB (Figura 6C e 6D). Esses resultados sugerem que a inibição da via canônica de Wnt exerce papel importante na manutenção das células leucêmicas de precursores B.

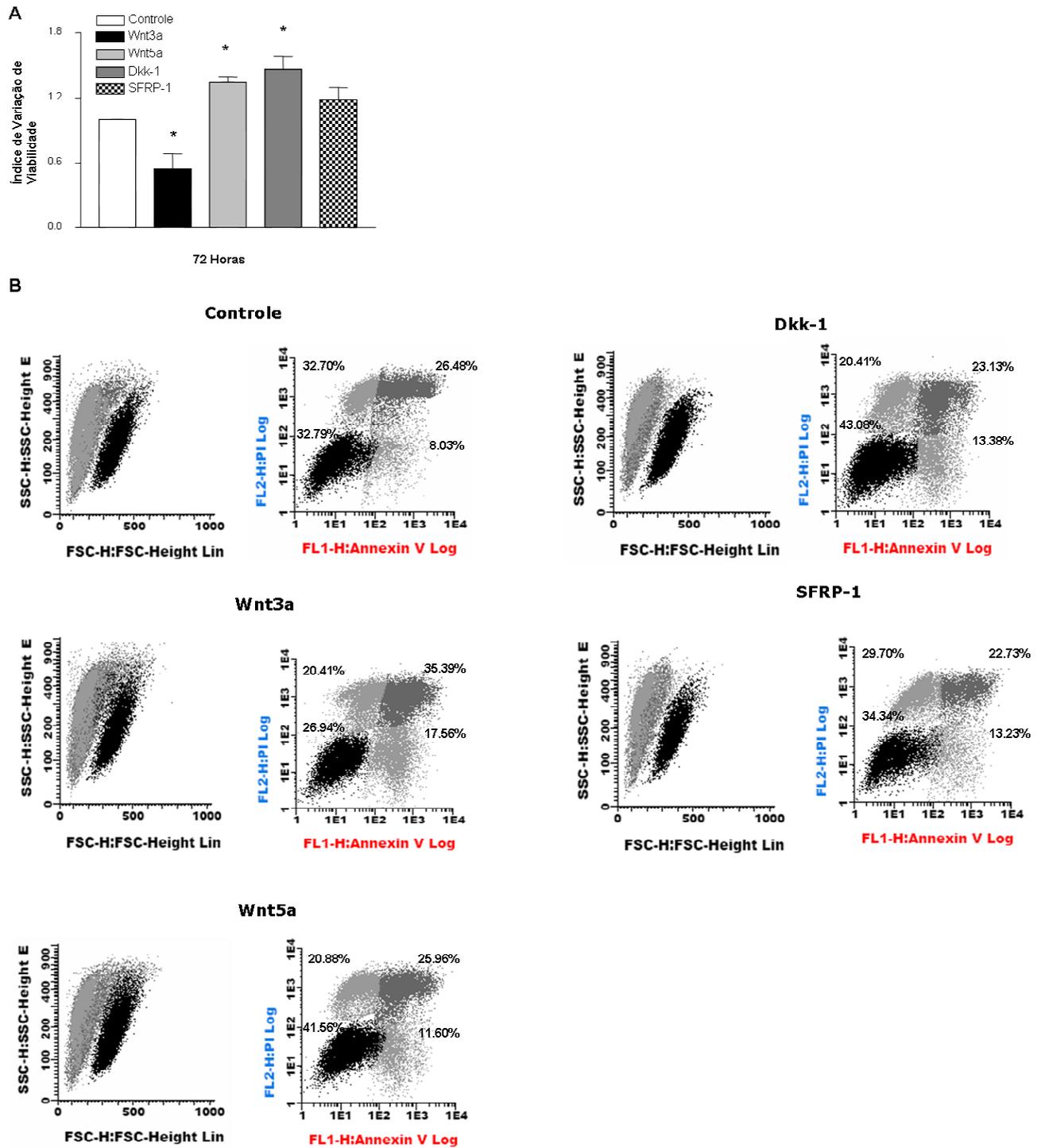


Figura 5: Wnt3a induz morte celular na linhagem Nalm-16 enquanto que Wnt5a e Dkk-1 aumenta a sobrevivência celular. A linhagem Nalm-16 foi tratada com a proteína recombinante purificada Wnt3a, agonista da via canônica, ou com os antagonistas clássicos conforme indicado. A viabilidade foi monitorada

por citometria de fluxo com marcação de Anexina-V e PI. A ativação canônica reduziu a sobrevivência celular das células leucêmicas enquanto que Wnt5a e Dkk-1 aumentaram as taxas de sobrevivência das células tumorais. SFRP-1 não apresentou impacto significativo nas taxas de sobrevivência. A taxa de variação de viabilidade foi obtida a partir do número absoluto de células Anexina-V⁻/PI⁻ (painel A, unidades arbitrárias) de três experimentos independentes realizados em triplicata (médias e erros-padrão são mostrados no gráfico). O valor da mediana das células sem tratamento (controle) é 1, usado como referência para calcular os outros valores das células tratadas com os moduladores da via. O perfil de FACS (painel B) apresenta resultados de 72 horas e é representativo de três experimentos independentes. * $P < 0.01$ (teste Mann-Whitney)

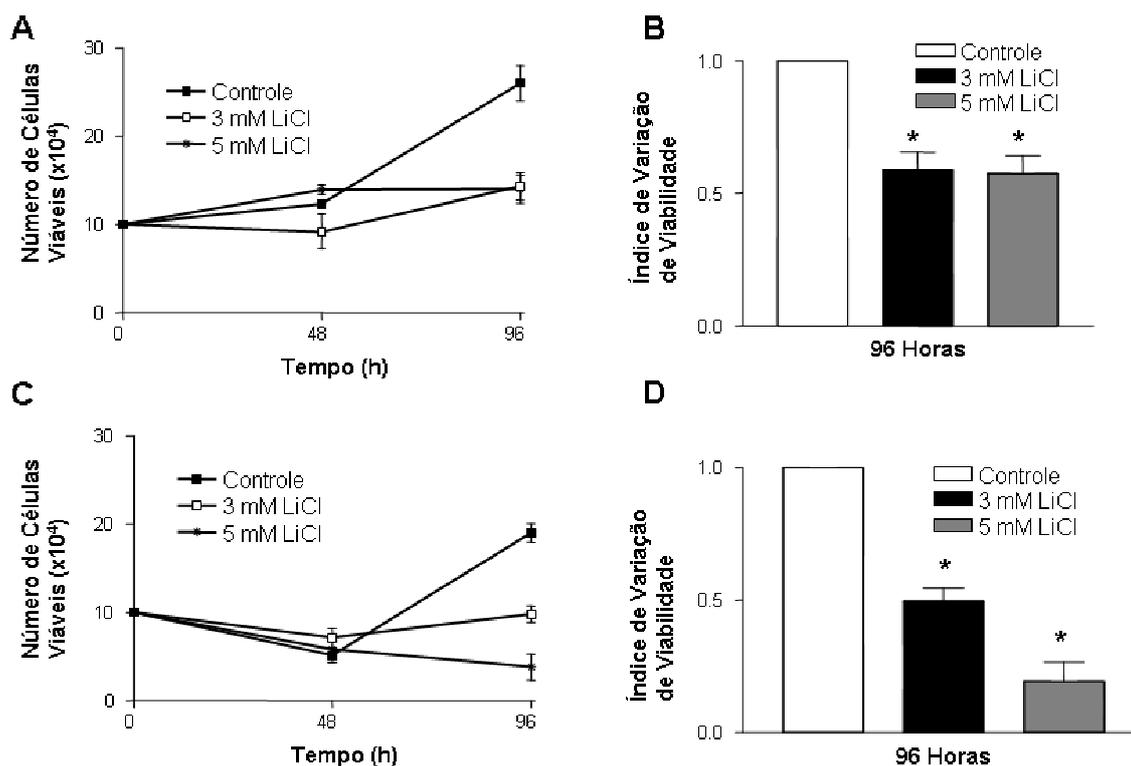


Figura 6: A inibição de GSK-3 β pelo LiCl induz morte celular na linhagem Nalm-16 e esse efeito é mais pronunciado em baixas concentrações de SFB. A linhagem Nalm-16 foi tratada com LiCl nas concentrações indicadas com 10% de SFB (A, B) ou 1% de SFB (C, D). O número de células viáveis e a taxa de variação de viabilidade foram monitorados pelo ensaio de exclusão de Azul de Trypan. O número de células viáveis (A, C) e a taxa de variação de viabilidade (B, D) são mostrados. Os resultados mostrados (médias e erros-padrão) são de dois experimentos independentes realizados em triplicata. * $P < 0.001$ (teste T não-pareado).

5.3 A ativação da via canônica de Wnt aumenta a sensibilidade da linhagem Nalm-16 a quimioterapia enquanto que os inibidores da via canônica induzem resistência à VP-16

Tendo em vista que os moduladores da via de Wnt são capazes que regular as taxas de sobrevivência das células de leucemia de precursores B, decidimos investigar se a modulação dessa via teria algum impacto em relação à resistência às drogas quimioterápicas. Para determinar esse efeito, a linhagem Nalm-16 foi tratada com meio condicionado de Wnt3a produzido por células L concomitantemente com 1 μ M VP-16. Nos tempo indicados, as células foram coletadas e a viabilidade avaliada por ensaio de exclusão de trypan. Previamente ao ensaio, a atividade do meio condicionado foi testada em células HEK 293T transfectadas com plasmídeo repórter contendo o promotor de TCF/LEF. Esse ensaio mostrou que o meio condicionado obtido era capaz de induzir satisfatoriamente ativação canônica nas células, como demonstrado pela atividade aumentada do repórter (Figura 7 A). Quando o meio condicionado de Wnt3a foi adicionado as culturas com 1 μ M VP-16, foi observado uma diminuição significativa no número de células viáveis sem mudanças no número de células globais (Figura 7 painel B a D). O efeito máximo foi observado após 48 horas, quando a viabilidade diminuiu cerca de 40% com o tratamento com o meio condicionado de Wnt3a (Figura 7C).

Em seguida, nossa intenção foi confirmar os resultados obtidos com a proteína Wnt3a purificada, para evitar possíveis interferências do meio condicionado. A linhagem Nalm-16 foi exposta a 100 ng/mL de Wnt3a purificado e 1 μ M VP-16, concomitantemente. A Figura 8A apresenta o índice de variação de

viabilidade, obtida a partir do número absoluto de células Anexina-V⁻/PI⁻ (painel A, unidades arbitrárias) de dois experimentos independentes realizados em triplicata. O valor da mediana das células tratadas apenas com VP-16 é 1, usado como referência para calcular os outros valores das células tratadas com quimioterapia e os moduladores da via. A figura 8B apresenta o perfil de apoptose por citometria de fluxo. Como observado nessas figuras, houve um intenso decréscimo da viabilidade de cerca de 50% quando as células foram tratadas com Wnt3a juntamente com o quimioterápico Etoposide, corroborando com os dados previamente descritos que indicam Wnt3a como um agente indutor de morte.

A incubação com antagonistas da via canônica (Wnt5a, Dkk-1 e SFRP-1) claramente induziu aumento da resistência à droga VP-16, como observado pelo maior percentual de células viáveis no perfil de citometria apresentado na Figura 8B. Nossos resultados indicam que a ativação canônica *in vitro* tem profundo impacto sob a sobrevivência das células após a exposição com quimioterapia enquanto que a inibição dessa via protege as células leucêmicas as morte induzida por Etoposide.

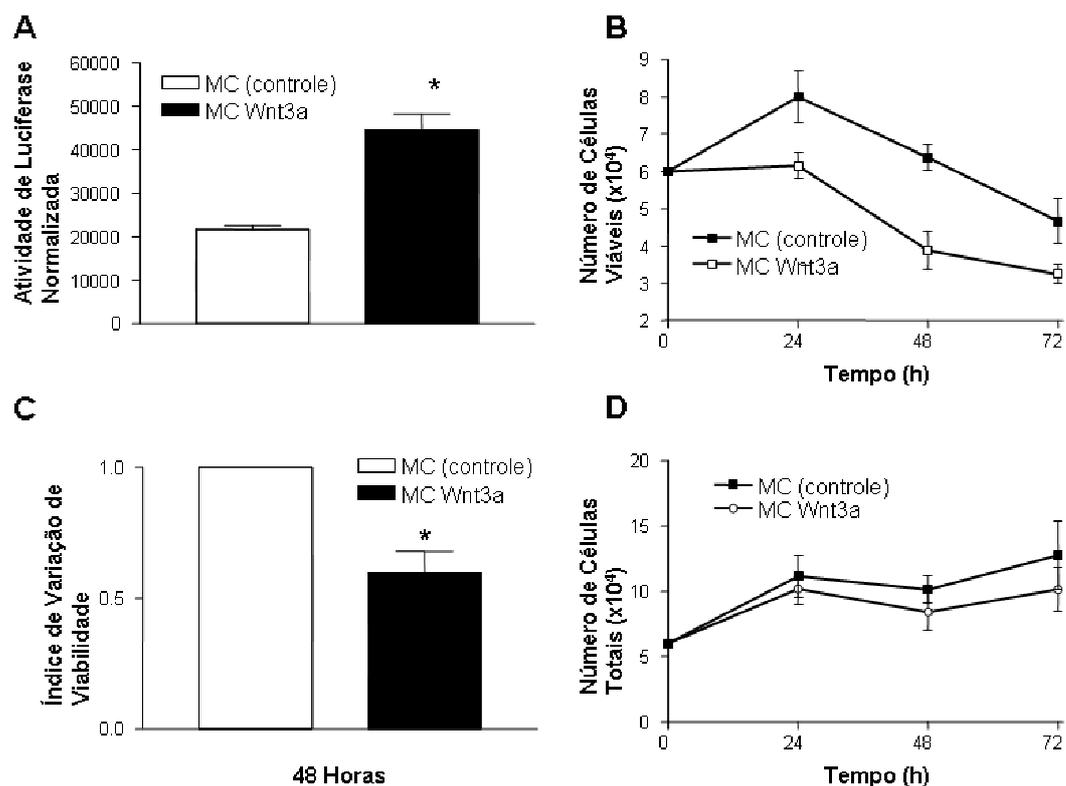


Figura 7. Meio condicionado de Wnt3a aumenta a sensibilidade *in vitro* das células Nalm-16 à Etoposide. Células HEK 293T foram transfectadas com o plasmídio repórter de TCF/LEF e o plaqueadas com 10% de meio condicionado, como descrito (A). A linhagem Nalm-16 foi simultaneamente tratada com 1 μ M etoposide e 10% de meio condicionado controle ou de Wnt3a como indicado. (B-D). Nos tempos especificados, a viabilidade foi avaliada pro ensaio de exclusão de Trypan. O meio condicionado de Wnt3 ativou a via canônica (A, unidades arbitrárias), induzindo uma diminuição do número de células viáveis (B) sem modificar o número de células globais. (D). A taxa de variação de viabilidade foi calculada com a contagem absoluta das células Anexina-V⁻/PI⁻ (C, unidades arbitrárias). Os resultados mostrados (médias e erros-padrão) de dois experimentos independentes realizados em triplicata são apresentados. * $P < 0.01$ (teste Mann-Whitney).

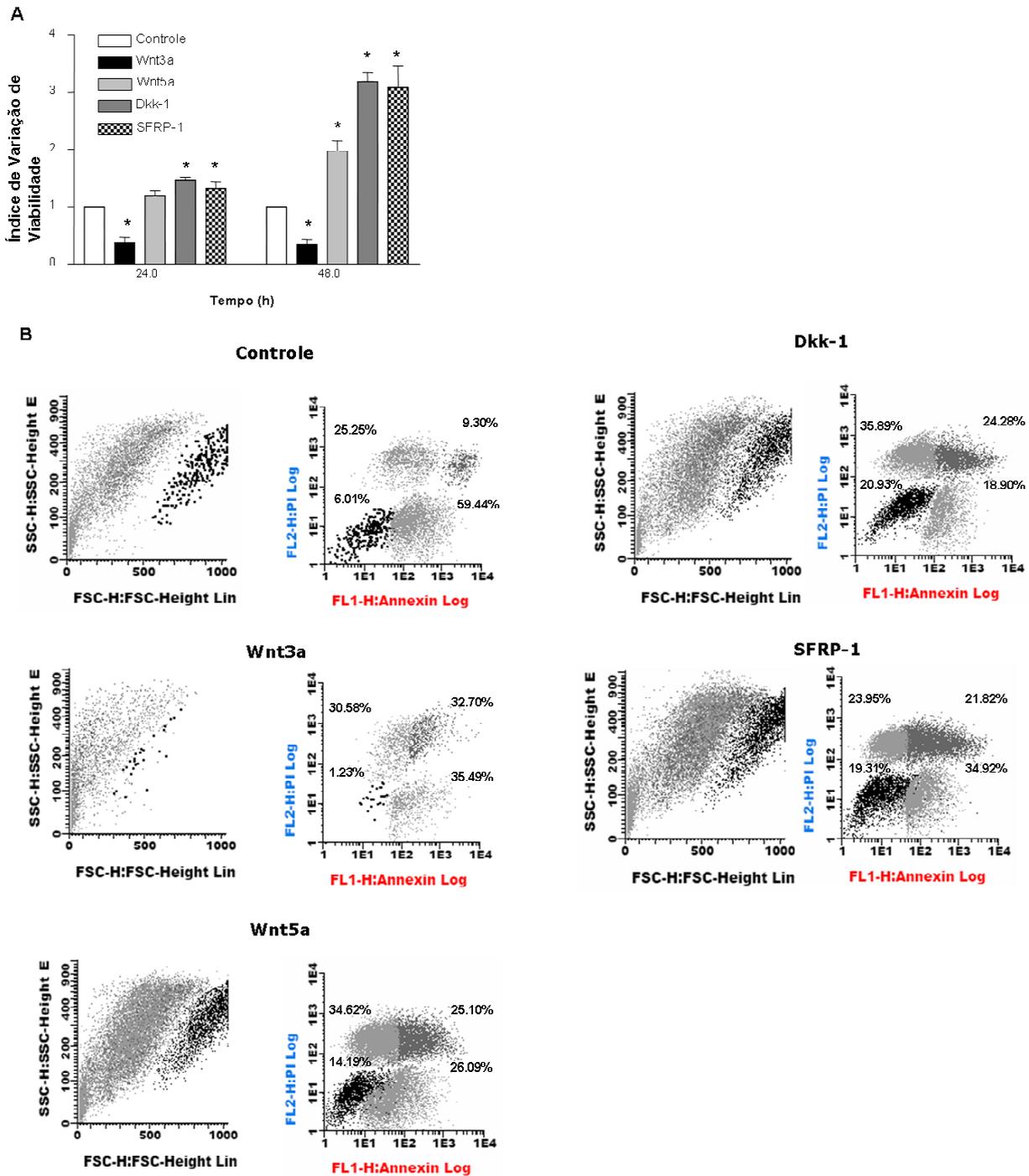


Figura 8. Wnt3a aumenta a sensibilidade de Nalm-16 ao quimioterápico Etoposide enquanto os antagonistas da via canônica induzem resistência à droga. Nalm-16 foi tratada com 10^{-6} M VP-16 e com o agonista canônico Wnt3a ou antagonistas da via. A viabilidade foi monitorada por citometria de fluxo

através de marcação com Anexina-V e PI. A taxa de variação de viabilidade foi obtida a partir do número absoluto de células Anexina-V/PI (painel A, unidades arbitrárias) de dois experimentos independentes realizados em triplicata (médias e erros-padrão são mostrados no gráfico). O valor da mediana das células tratadas apenas com VP-16 é 1, usado como referência para calcular os outros valores das células tratadas com quimioterapia e os moduladores da via. O perfil de FACS mostra resultados de 48 horas e é representativo de dois experimentos independentes (painel B). * $P < 0.05$ (teste Mann-Whitney).

5.4 A modulação da via de Wnt não modifica as taxas de proliferação celular da linhagem Nalm-16

Uma vez que a manutenção da população celular é resultado de um equilíbrio fino entre proliferação e sobrevivência e reconhecendo a importância da proliferação como um dos mecanismos de sensibilidade à drogas, nosso próximo objetivo foi investigar se a modulação da via de Wnt poderia exercer algum efeito no ciclo celular das células leucêmicas. Para isso, a linhagem Nalm-16 foi tratada com proteínas purificadas da via de Wnt, tanto com ativadores (Wnt3a) quanto com inibidores da via canônica (Wnt5a, Dkk-1, SFRP-1) e o conteúdo de ADN foi determinado por marcação com PI em 24, 48 e 72 horas seguido de aquisição por citometria de fluxo. A análise dos resultados mostrou que a modulação da via na linhagem Nalm-16 não foi capaz de modificar o perfil de ciclo celular, uma vez que o percentual de células nas diferentes fases do ciclo (G1/G0 e S/G2/M) não variou (Figura 9).

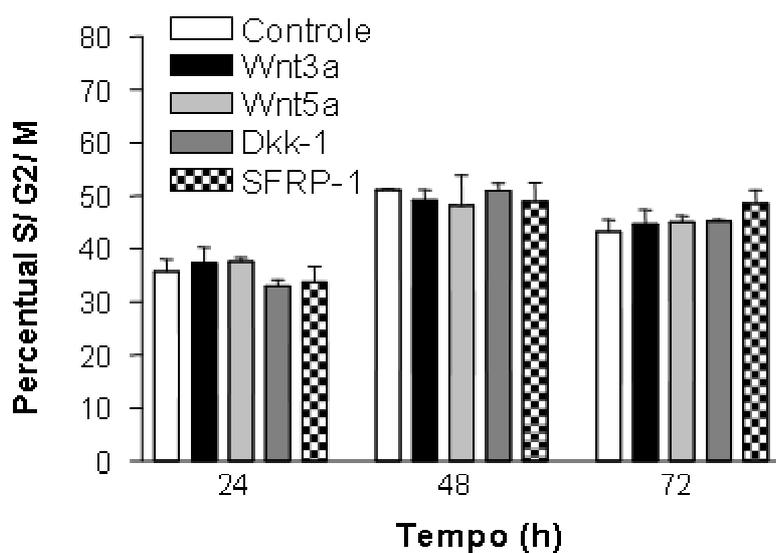


Figura 9. Ativação ou inibição da via de Wnt não modifica a proliferação da linhagem leucêmica Nalm-16. Nalm-16 foi tratada com proteínas purificadas e o conteúdo de ADN foi determinado através de marcação com PI por citometria de fluxo. A modulação da via de Wnt não teve impacto na proliferação celular. São apresentados resultados (média e erro-padrão) de dois experimentos independentes realizados em triplicata.

5.5 O perfil de Expressão Gênica das Células Leucêmicas de Precursores B corrobora com os achados funcionais relacionados à via de Wnt.

A análise molecular da expressão do ARNm pelas linhagens celulares e pelas células CD19⁺ obtidas de células mononucleares de pacientes com LLA prec.-B é mostrada na Figura 10. Como mostrado na figura citada, ambas as linhagens celulares e todas as células CD19⁺ de pacientes expressam transcritos de LEF-1 (Fig. 10, linha 1) e Fzd-3 (Fig. 10, linha 2), indicando que as células leucêmicas são potencialmente sensíveis à sinalização de Wnt. Em congruência com nossos dados funcionais que indicam que Wnt3a poderia atuar como um gene supressor de tumor para as células de LLA Prec.-B, não foi detectada expressão de ARNm de Wnt3a nas linhagens celulares e nem nas amostras de pacientes testados (Fig. 10, linha 3). Da mesma forma, ARNm de Wnt5a (Fig. 10, linha 4) também não foi detectado em nenhuma das amostras analisadas enquanto que os transcritos de Dkk-1 foram encontrados nas amostras de pacientes mas não nas linhagens celulares (Fig. 10, linha 5), sugerindo que as células primárias são ainda dependentes da sinalização externa. Os transcritos de SFRP-1 (Fig. 10, linha 6) e SFRP-2 (Fig. 10, linha 7) estavam ausentes nas linhagens celulares enquanto SFRP-2 foi identificado em baixos níveis de expressão em duas amostras de pacientes e ausentes em dois outros, sugerindo que, pelo menos em alguns casos, as células leucêmicas primárias são dependentes de sinais de sobrevivência. Complementar com a idéia de que o estroma é também um provedor de sinais de modulação da sobrevivência das células leucêmicas, foi identificada a expressão de ARNm para Dkk-1, SFRP-1 e SFRP-2 em células estromais de medula óssea normal.

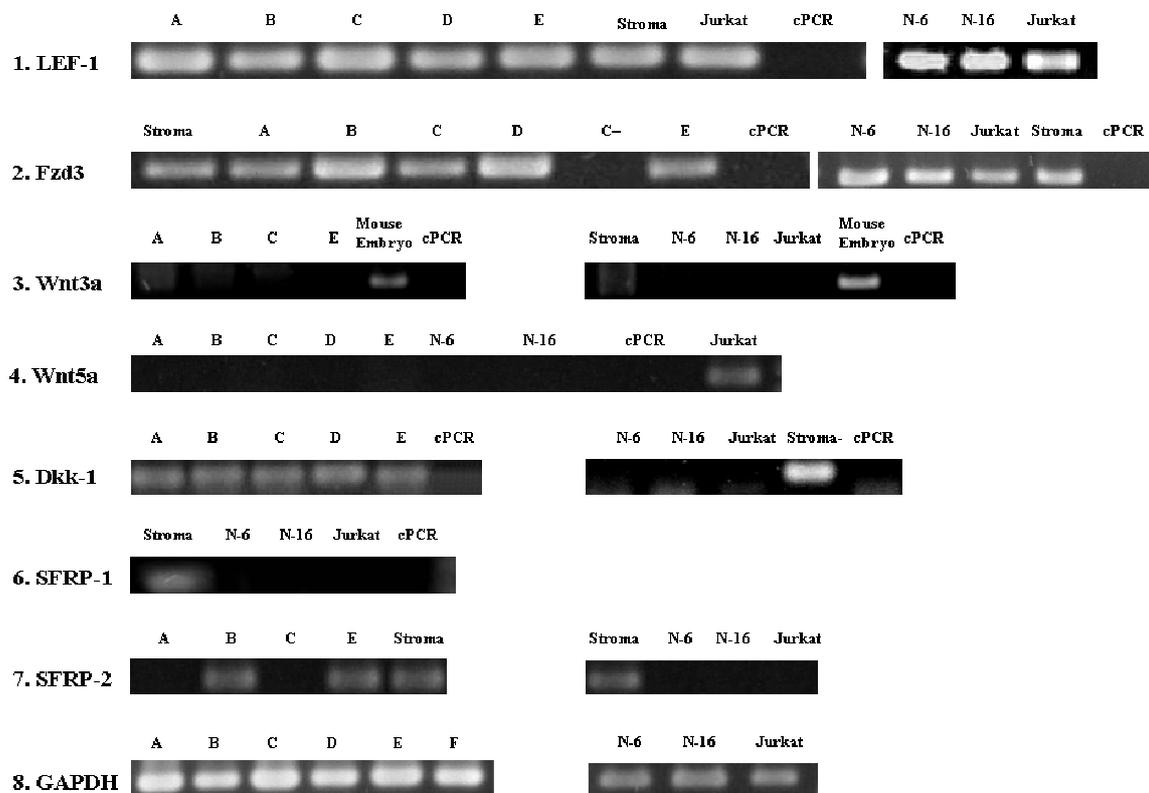


Figura 10. Perfis de Expressão Gênica: Padrão de expressão de ARNm de membros da via de Wnt em células de LLA Prec.-B. O ARN total foi extraído de células leucêmicas e de células estromais de medula óssea normal, o ADNc foi sintetizado e usado com oligonucleotídeos iniciadores específicos para amplificação da PCR, como especificado. Amostras de pacientes (A-E; A: BIII /LLA Pre-B; B, C and E: BII/ LLA comum; D: BI / LLA Pro-B), células de estroma de medula óssea de doadores normais, linhagens Nalm-16 (N-16), Nalm-6 (N-6) e Jurkat e os controles negativos (C- ou cPCR) são apresentados na figura.

5.6 Tratamento com Etodolac Racêmico induz morte celular nas linhagens Nalm-16 e Nalm-6 através de mecanismo independente de COX-II.

Com o intuito de testar o impacto do tratamento com o antiinflamatório Etodolac na sobrevivência de células leucêmicas, células das linhagens Nalm-16 e Nalm-6 foram tratadas com concentrações crescentes do fármaco e os dados comparados com as células tratadas apenas com o veículo DMSO. A análise do perfil de morte celular foi feita através do ensaio de exclusão de Azul de Trypan e também por marcação com Anexina-V e PI com posterior aquisição por citometria de fluxo.

Nossos dados mostraram que a incubação das células com Etodolac reduziu significativamente a sobrevivência celular de ambas as linhagens testadas. Os efeitos citotóxicos foram observados pela microscopia óptica de contraste de fase, na qual se observou mudanças morfológicas indicativas de sofrimento ou morte celular, como presença de *blebs* na membrana plasmática, alterações de tamanho celular e fragmentos celulares difusos por todo sobrenadante, tanto na linhagem Nalm-16 (Figura 11B) quanto na linhagem Nalm-6 (Figura 11E). O tratamento com DMSO (Figura 11A e 11D) ou NS-398 (Figura 11C e 11F) não produziu os efeitos citopáticos observados com a incubação com Etodolac.

O estudo de morte celular por citometria de fluxo confirmou a intensa redução do número de células viáveis em ambas as linhagens analisadas (Figura 12E), efeito também observado pelo ensaio de exclusão de Azul de Trypan (Figura 12A e C). Os dados de imunofenotipagem mostram que o tratamento com Etodolac induz apoptose inicial em 24 horas, indicada pela externalização da fosfatidilserina (Anexina-V⁺) e pela manutenção da integridade de membrana (PI)

(Figura 12E). Com o decorrer da cultura celular, as células leucêmicas tratadas foram progressivamente apresentando características de apoptose tardia, marcada pela externalização da fosfatidilserina e perda de integridade de membrana (células Annexina-V⁺/PI⁺) e finalmente de necrose, estágio no qual as células apresentam apenas a membrana rompida (Annexin-V⁻/PI⁺), em 72 horas (Figura 12G). Nossos resultados claramente demonstraram que Etodolac é citotóxico para as linhagens de precursores B.

O tratamento com Etodolac também reduziu o número de células totais, sugerindo um impacto potencialmente relevante na redução da massa tumoral (Figura 12B e 12D). Vale ressaltar que o efeito citotóxico observado é dose-dependente, já que o efeito foi significativamente maior na maior concentração testada (500 μ M).

Uma vez que os efeitos dos NSAIDs têm sido associados com a atividade inibitória de COX-II, nosso próximo objetivo foi avaliar se a inibição desta enzima era capaz de produzir efeitos citotóxicos semelhantes. Para esse ensaio, a linhagem Nalm-16 foi incubada com NS-398, um inibidor específico de COX-II. A atividade citotóxica de Etodolac não foi induzida por mecanismos dependentes de COX-II, uma vez que o inibidor NS-398 não induziu morte da linhagem Nalm-16.

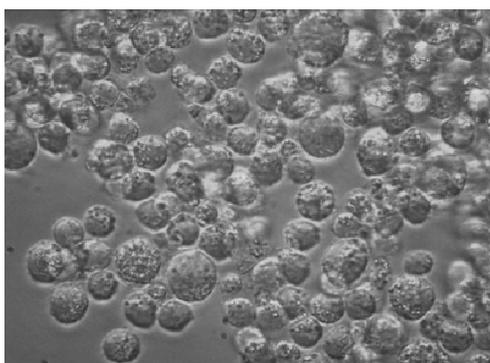
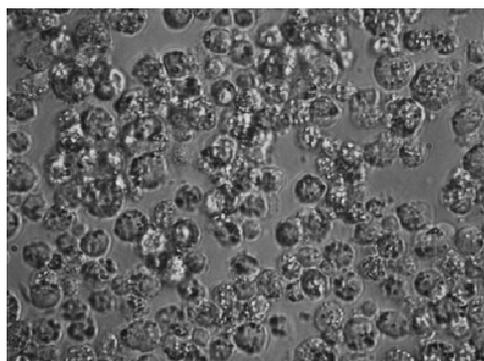
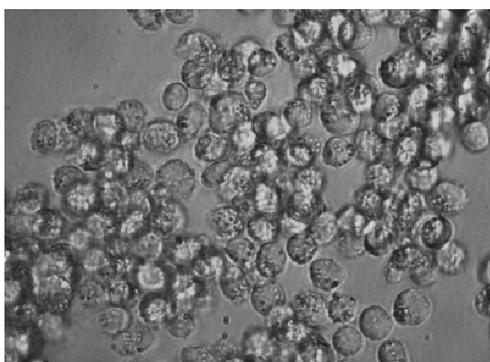
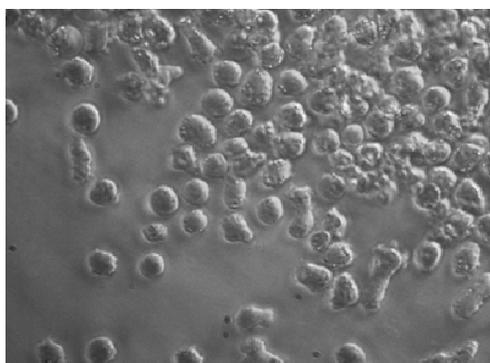
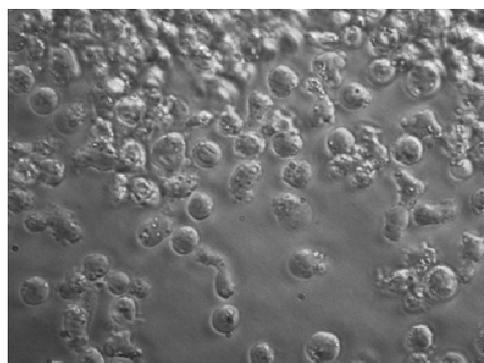
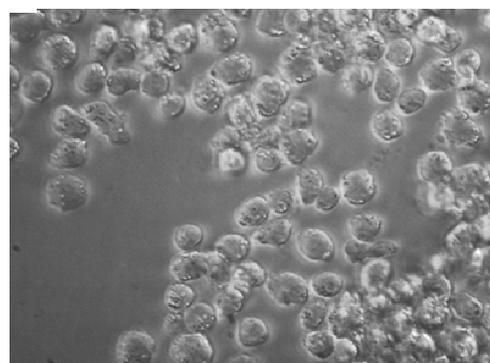
A **CONTROLE DMSO****B** **ETODOLAC 500 μ M****C** **NS-398 10 μ M****D** **CONTROLE DMSO****E** **ETODOLAC 500 μ M****F** **NS-398 10 μ M**

Figura 11. As linhagens celulares Nalm-16 e Nalm-6 sofrem efeitos citopáticos compatíveis com sofrimento e morte celular. Nalm-16 (A-C) e Nalm-6 (D-F) foram tratadas com 500 μ M de Etodolac e comparadas com os controles incubados com veículo (DMSO). O efeito da inibição de COX-II foi também analisado utilizando o agente NS-398. As alterações morfológicas foram observadas por microscopia óptica de contraste de fase. (magnificação: 400X).

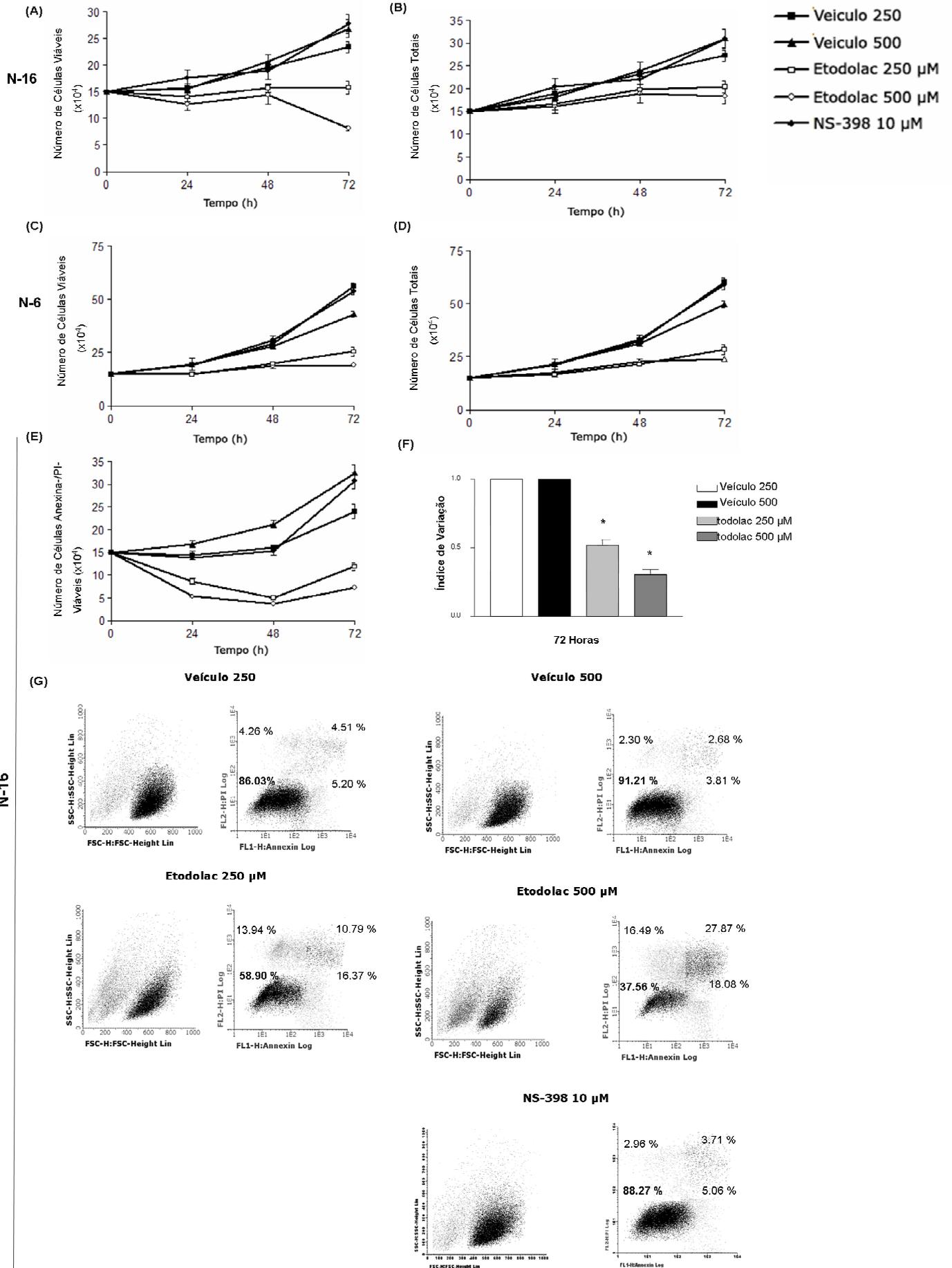


Figura 12. Etodolac induz morte celular nas linhagens leucêmicas através de mecanismo independente de COX-II. Nalm-16 ou Nalm-6 foram tratadas com 250 ou 500 μ M de Etodolac e comparadas com os controles incubados com veículo (DMSO). O efeito da inibição de COX-II foi também analisado utilizando o agente NS-398. A viabilidade foi monitorada por citometria de fluxo através de marcação com Anexina-V e PI. O tratamento com Etodolac diminuiu a expansão de células viáveis nas linhagens Nalm-16 (A) e Nalm-6 (C) e diminuiu o número de células totais de Nalm-16 (B) e Nalm-6 (D). A citometria de fluxo revelou que o tratamento diminuiu a viabilidade da linhagem Nalm-16 (E-G). O perfil de FACS mostra resultados de 72 horas e é representativo de três experimentos independentes (G). O * refere-se à diferença estatisticamente significativa entre controles e tratado e entre as diferentes doses testadas. Esses efeitos não foram mediados pela atividade de inibição de COX-II (A-G). São apresentados resultados (média e erro-padrão) de três experimentos independentes realizados em triplicata. * $P < 0.05$ (teste Mann-Whitney).

5.7 Tratamento com Etodolac Racêmico reduz a proliferação da linhagem leucêmica Nalm-16 através de um mecanismo independente de COX-II

Tendo em vista que o tratamento com Etodolac induziu redução do número de células totais, nós decidimos investigar se esse anti-inflamatório é capaz de modular a dinâmica de ciclo celular das células leucêmicas. Em 24 horas, nenhuma diferença foi encontrada entre os controles e os tratados mas em 48 horas foi observado uma diferença marcante na fração de células em S/G2/M (Figura 13A). Tanto 250 μ M quanto 500 μ M diminuíram a proliferação celular, e esse efeito foi mais pronunciado em altas concentrações (Figura 13A-C). O tratamento com Etodolac reduziu a fração de células em S/G2/M em 35% na concentração de 250 μ M e em 50% na dose mais elevada. Esse efeito citostático foi independente de inibição de COX-II (Figura 13C).

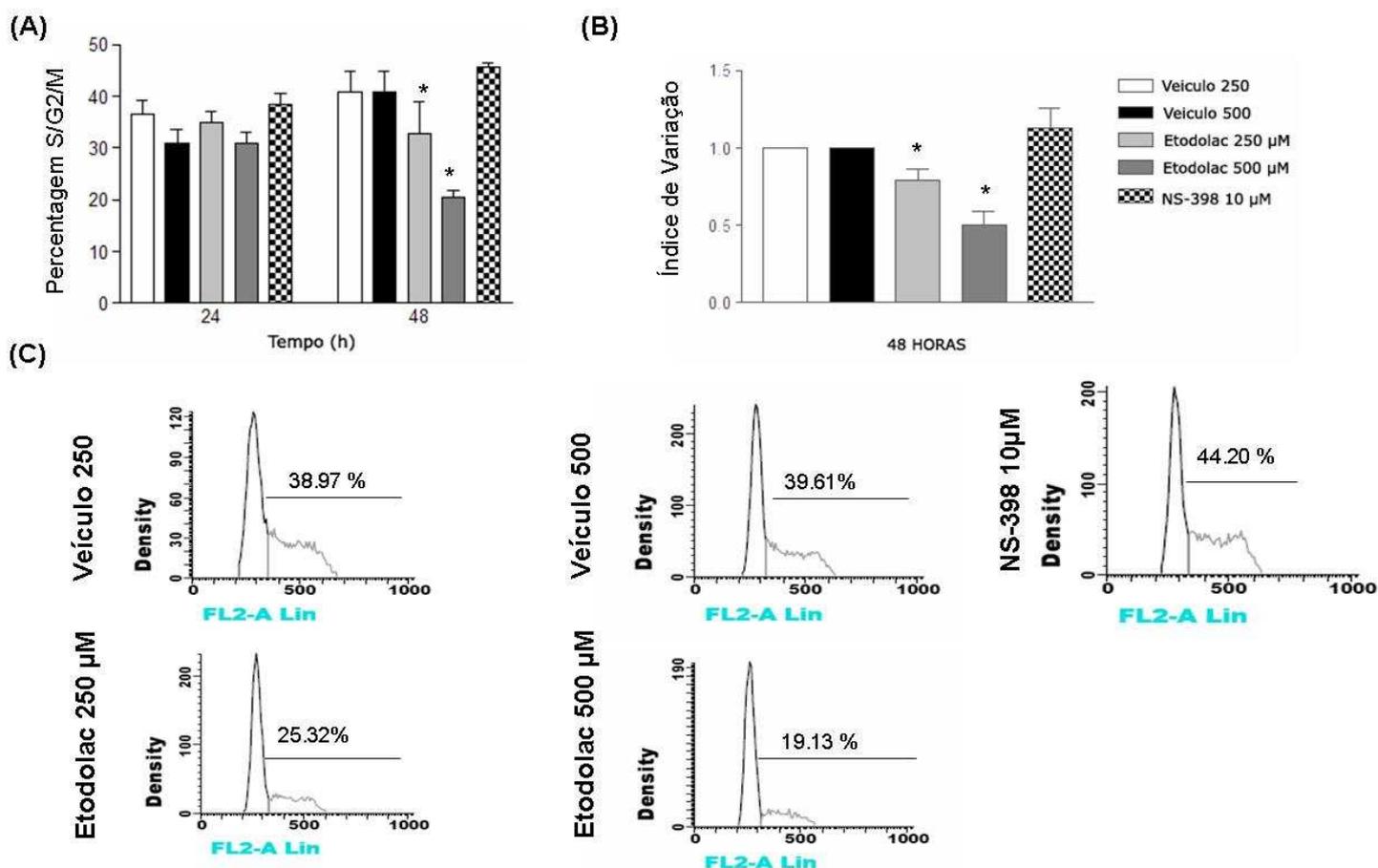


Figura 13. O tratamento com Etodolac Racêmico inibe crescimento celular da linhagem celular Nalm-16 através de mecanismo independente de COX-II. A linhagem Nalm-16 foi tratada com 250 ou 500 μ M de Etodolac e comparada com os controles incubados com veículo (DMSO). O efeito da inibição de COX-II foi também analisado utilizando o agente NS-398. O conteúdo de ADN foi determinado através de marcação com PI por citometria de fluxo. O tratamento com Etodolac diminuiu dramaticamente o percentual de células em S/G2/M de maneira dose e tempo-dependente e esse efeito não foi mediado pela inibição de COX-II (A-C). O painel B mostra as mudanças em 48 horas e * representa a diferença estatisticamente significativa entre controles e tratado e entre as diferentes doses testadas (unidades arbitrárias). São apresentados resultados (média e erro-padrão) de dois experimentos

independentes realizados em triplicata. O perfil de FACS mostra resultados de 48 horas e é representativo de dois experimentos independentes (painel C). * $P < 0.0001$ (teste Mann-Whitney).

6 DISCUSSÃO

O conceito de terapia alvo-dirigida foi cunhado pela primeira vez por Paul Ehrlich no início do século XX, que nomeou de “balas mágicas” (*magic bullets*) compostos que poderiam atacar especificamente as células doentes, preservando as saudáveis (EHRlich, 1907). Esse termo surgiu baseado em diversos estudos realizados por Ehrlich, como a invenção da técnica de coloração de células sanguíneas, da qual o cientista alemão inferiu que compostos químicos possuem diferentes afinidades moleculares pelas células e essa afinidade diferencial poderia ser explorada para fins terapêuticos. Outro trabalho decisivo de Paul para a conceitualização seminal da terapia alvo-dirigida, foi a descoberta de que compostos de arsênio eram capazes de atacar a bactéria causadora da Sífilis. Por essa mesma descoberta, Paul Ehrlich ficou conhecido também por ser o fundador do conceito de Quimioterapia, termo também cunhado por ele.

Para o desenvolvimento de novas ferramentas terapêuticas alvo-específicas contra o câncer, é mandatória a investigação do papel de vias de sinalização específicas nas células tumorais. Os modelos estabelecidos nesse trabalho indicam que tanto a modulação da via de Wnt quanto a administração de Etodolac modulam as taxas de sobrevivência das células leucêmicas. Ainda, a modulação da via de Wnt é também capaz de regular a resistência das células leucêmicas à quimioterapia. Essas ferramentas terapêuticas possuem grande potencial clínico, podendo vir a contribuir para a redução das taxas de recaída e conseqüente aumento das taxas de sobrevida dos pacientes de LLA Prec.-B.

Evidências crescentes têm surgido na literatura relacionando o papel da via de Wnt/ β -catenina nas malignidades de células B. Após a ativação canônica da via de Wnt, a β -catenina é translocada para o núcleo aonde conjuntamente com LEF-1

induz transcrição gênica (ZHAO *et al*, 2007). Apesar das linhagens leucêmicas aqui estudadas expressarem constitutivamente ARN mensageiro de LEF-1, foram detectados baixos níveis da proteína β -catenina total na linhagem Nalm-6, analisado por *Western Blot* e distribuição predominantemente membranar observado na Nalm-16 através de imunofluorescência. O acúmulo de β -catenina na porção interna da membrana citoplasmática contribui na adesão homotípica e essa localização celular impede a β -catenina de ser deslocada para o núcleo e de contribuir para a transcrição gênica. Assim, esses dados sugerem que em ambas as linhagens celulares estudadas, a via canônica encontra-se desativada. Nossos dados são concordantes com os achados de SERINSÖZ e colaboradores que publicaram um trabalho em 2004 com amostras de biópsia de medula comparando os níveis de expressão de ARN mensageiro e de β -catenina em pacientes com desordens hematológicas (LMA, LLA, LMC e desordens mieloproliferativas sem cromossomo Philadelphia) que revelou que os níveis do transcrito de β -catenina são mais elevados em LMA do que nas LLAs. Contudo, a análise da expressão da proteína indicou ausência de β -catenina nas células neoplásicas da LLA, sugerindo que a ativação da via canônica não desempenha papel central na LLA em contraposição com a LMA. Os autores sugerem, inclusive, que a análise dos níveis de β -catenina possa servir de ferramenta diagnóstica para discriminar LMA de LLA (SERINSÖZ *et al*, 2004).

De fato, a distribuição da β -catenina é determinante no comportamento de outros tipos de células tumorais e pode definir momentos muito distintos da progressão tumoral. Em um modelo de metástase de carcinoma cólonretal, pesquisadores identificaram que as células mais diferenciadas, localizadas no tumor primário ou na região central dos tumores metastásicos, expressavam β -

catenina apenas na membrana celular ao passo que as células mais indiferenciadas, localizadas no *front* de invasão das metástases, apresentavam a β -catenina localizada no núcleo. Desta forma, essa localização diferencial permite distinguir as células que estão passando pelo processo de transição epitélio-mesenquimal das que já estão em franca expansão no leito tumoral (BRABLETZ *et al*, 2001).

Apesar da via canônica não estar constitutivamente ativa nas células leucêmicas aqui estudadas, a expressão de ARN mensageiro para LEF-1 e Fzd-3 encontrada pelo nosso grupo sugere que as células leucêmicas são potencialmente sensíveis a estimulação externa da via de Wnt e portanto, a modulação dessa via pode ter impactos significativos na biologia dessas células.

O fator Wnt3a tem sido de longe o agonista canônico mais estudado da via de Wnt, principalmente porque é um dos poucos fatores que possui meio condicionado disponível e, mais recentemente, proteínas recombinantes purificadas. No entanto, o papel desse fator na biologia das células de LLA Prec.-B permanece controverso. Em 2007, um grupo publicou um trabalho mostrando que Wn3a induzia a translocação de β -catenina para o núcleo e inibia a proliferação de várias, mas não todas, linhagens de LLA Prec.-B (NYGREN *et al*, 2007). As taxas de sobrevivência celular não foram moduladas pelo tratamento com Wnt3a. Outro grupo de pesquisadores mostrou que a ativação de células de LLA Prec.-B com Wnt3a induziu acúmulo de β -catenina nuclear e aumento da proliferação e sobrevivência celular (KHAN *et al*, 2007). No nosso modelo, o tratamento com Wnt3a, tanto na forma de meio condicionado quanto com a proteína recombinante purificada, induziu intensa diminuição da taxa de sobrevivência das células leucêmicas sem modificar as taxas de proliferação das células viáveis. Desta forma, esses dados sugerem que a ativação canônica com

Wnt3a funciona como um agente supressor de tumor nas LLA Prec.B. Esse dado está de acordo com um trabalho recente de ZHAO e colaboradores, mostrando que a deleção de β -catenina em células hematopoéticas de camundongos reduziu a capacidade de formação de LLC induzida por pela translocação cromossomal BCR-ABL (cromossomo *Philadelphia*) enquanto que facilitou a progressão da LLA induzida pela mesma translocação (ZHAO *et al*, 2007).

Em consonância com os dados discutidos acima, o tratamento das células leucêmicas com LiCl, um agente bem conhecido que mimetiza a via canônica de Wnt pelo bloqueio de GSK3- β , também induziu aumento da morte celular da linhagem Nalm-16. Apesar do LiCl ter, em geral, efeitos anti-apoptóticos, particularmente em células neurais, tem sido demonstrado também efeitos pró-apoptóticos em diversas linhagens celulares, como nas células promielocíticas de LMA M3 (HL-60), nas células de crise blástica da LMC (K562) e nas células renais de macaco (COS7). Os fatores responsáveis pelos efeitos apoptóticos são desconhecidos, mas estudos de VAN GIJN e colaboradores mostram que o acúmulo de β -catenina pode induzir apoptose, sustentando assim a hipótese de envolvimento da β -catenina na morte induzida por LiCl nas células leucêmicas estudadas pelo nosso grupo (VAN GIJN *et al*, 2001). Além disso, a superexpressão de b-catenina *per se* pode induzir apoptose independentemente de LEF-1 (KIM *et al*, 2000). De qualquer forma, o envolvimento de GSK3 β na sobrevivência celular representa uma ferramenta terapêutica interessante uma vez que pode induzir sobrevivência ou apoptose dependendo do estresse ao qual a célula é submetida (FORDE & DALE, 2007). Conjuntamente, nossos dados sugerem que a ativação canônica da via de Wnt pode, de fato, ter um impacto negativo na sobrevivência das células leucêmicas. Nosso grupo também demonstrou que a incubação com os

fatores inibidores Wnt5a e Dkk-1 induziu aumento das taxas de sobrevivência, reforçando os benefícios da inibição canônica para a manutenção das células de LLA Prec.-B. A expressão pelas células estromais de medula óssea normal dos transcritos Dkk-1, SFRP-1 e SFRP-2 sugere que a interação juxtácrina das células leucêmicas com as células estromais possa constituir um importante meio de inibição da via canônica, sustentando a sobrevivência das células tumorais no microambiente medular. De fato, a sinalização pelo estroma é essencial para a manutenção e progressão das células leucêmicas *in vivo*.

A produção de antagonistas da via de Wnt foi também observada pelo nosso grupo nas células leucêmicas purificadas de pacientes com LLA Prec.-B. Células CD19⁺ desses pacientes expressam constitutivamente transcritos de Dkk-1 e SFRP-2 enquanto as linhagens são negativas para o ARNm dessas moléculas, o que deve refletir a dependência das células leucêmicas primárias de sinais de sobrevivência externos. A ausência de ARNm de SFRP-2 em dois pacientes pode ser devido aos baixos níveis de sinais ou indicar variabilidade entre amostras. Apesar de não termos conseguido demonstrar a expressão do transcrito Wnt5a em nenhuma das células de pacientes ou linhagens testadas, um trabalho publicado por Etheridge e colaboradores mostra que essa molécula está presente nas células estromais de medula óssea normal (ETHERIDGE *et al*, 2004), as quais poderiam fornecer através da adesão celular a sinalização para as células leucêmicas.

Uma vez que esses moduladores são capazes de regular a sobrevivência das células leucêmicas, nosso próximo objetivo foi avaliar se a regulação dessa via possuía também algum papel na resistência às drogas. Foi observado aumento de sensibilidade à Etoposide das Nalm-16 após incubação com Wnt3a. Congruente com esses dados, a ausência de expressão de ARN mensageiro de Wnt3a nas

linhagens celulares e nas amostras de pacientes enfatiza o papel regulador negativo da ativação canônica nas células de LLA Prec.-B. Células estromais de medula óssea também são desprovidas de transcritos de Wnt3a (ETHERIDGE *et al*, 2004). Conjuntamente, nossos dados sugerem que, pelo menos em nosso modelo, Wnt3a funciona como um autêntico gene supressor de tumor, induzindo morte celular nas células malignas tanto nas condições normais quanto após estímulo genotóxico com Etoposide.

Os mecanismos implicados na sensibilidade ao Etoposide induzida por Wnt3a permanecem absolutamente desconhecidos. Nossos dados mostram que nenhum dos moduladores da via, nas concentrações testadas, foi capaz de modificar o perfil de proliferação celular e, desta forma, esse mecanismo provavelmente não está implicado no fenômeno de resistência. Por sua vez, a sensibilidade aumentada ao VP-16 poderia ser pelo menos parcialmente explicada pelo aumento da expressão de topoisomerase II α após o tratamento com Wnt3a, como demonstrado no trabalho de Khan (KHAN *et al*, 2007). Uma vez que o quimioterápico Etoposide é um inibidor específico da ADN topoisomerase-II, o aumento da quantidade de alvos moleculares dessa droga pelo agonista Wnt3a poderia aumentar a sensibilidade das células leucêmicas a essa droga. Sendo esse o mecanismo mais provável de indução de sensibilidade, podemos supor que outras drogas quimioterápicas que tenham como alvo molecular a ADN topoisomerase-II, como Daurorubicina e Daunorubicina, poderiam ter seus efeitos modificados quando usadas conjuntamente com o agonista Wnt3a.

Em contraste com achados recentes que sugerem Wnt5a como um gene supressor de tumor e que sua inativação pode conferir mau prognóstico a pacientes com LLA (JIANMING *et al*, 2007), nossos dados apontam que Wnt5a é capaz de

proteger as células leucêmicas da morte induzida por quimioterapia. Essa aparente discrepância pode refletir diferenças entre os modelos usados em ambos os estudos. No entanto, concordante com nossos dados, foi demonstrado que Wnt5a é capaz de inibir a via canônica promovendo degradação de β -catenina através de mecanismo independente de GSK-3 β (TOPOL *et al*, 2003). No trabalho aqui apresentado, nós mostramos que outros dois inibidores canônicos (Dkk-1 e SFRP-1) também induziram resistência às drogas nas células leucêmicas. Esse resultados estão em consonância com dados previamente apresentados por De Toni, no qual a inibição da via de Wnt através da incubação com Wnt5, SFRP-1 ou Dkk-1 induziu resistência à Doxorubicina em células de LMA de forma tão intensa quanto a adesão celular à fibronectina (DE TONI *et al*, 2006). Apesar da β -catenina ter sido associada como um fator de sobrevivência em diversos trabalhos com células leucêmicas, esses autores mostraram que os níveis de β -catenina estavam muito baixos nos blastos resistentes tratados com antagonista de Wnt. No entanto, a inibição de GSK-3 β aboliu a resistência à droga tanto induzida por adesão celular quanto pelos inibidores de Wnt, sugerindo que GSK-3 β seja o efetor desse fenômeno (DE TONI *et al*, 2006). De fato, essa enzima é o elo entre a sinalização de integrinas e da sinalização de moléculas da via de Wnt.

Outros trabalhos em modelos de tumores sólidos também apresentaram a idéia de que moduladores negativos são importantes na manutenção da sobrevivência e resistência à quimioterapia. Células de osteosarcoma transfectadas com Dkk-3 não entram em apoptose e possuem resistência aumentada quando as células são privadas de soro ou quando são expostas a Cisplatina ou Doxorubicina (HOANG *et al*, 2004). Outro grupo de investigadores mostrou que células de câncer de mama negativas para receptores de estrogênio e progesterona, que

cursam com prognóstico ruim, expressam preferencialmente Dkk-1 quando comparadas com os cânceres de mama positivos para esses receptores. Os autores sugerem que Dkk-1 seja um potencial marcador prognóstico e diagnóstico dos cânceres de mama de mau prognóstico (FORGET *et al*, 2007).

Nossos dados sugerem que a ativação canônica da via de Wnt exerce efeito supressor de tumor e consequentemente sua inibição pode sustentar a sobrevivência das células leucêmicas de precursores B, tanto durante o processo de progressão tumoral quanto no fenômeno de resistência à quimioterapia. Desta forma, a ativação da via de Wnt pode ser de grande valia para a redução das taxas de recaída nos pacientes de LLA Prec.-B.

No outro braço do estudo, avaliamos o uso de uma nova estratégia terapêutica baseado no uso de antiinflamatório não-esteroidal na sobrevivência e proliferação de células de LLA Prec.-B. Essa escolha foi baseada na observação de que muitos estudos epidemiológicos têm fornecido evidências de que a administração prolongada de NSAIDs possui efeitos profiláticos contra determinados cânceres como o câncer colorretal (KUNE *et al*, 1988; ROSEMBERG *et al*, 1991), pulmão (SCHREINEMACHERS *et al*, 1994) e leucemia (KASUM *et al*, 2003).

Para isso, foi escolhido o fármaco Etodolac, um antiinflamatório não-esteroidal usado no tratamento da osteoartrite, artrite reumatóide e no manejo da dor aguda há mais de vinte anos (VETTER *et al*, 1982).

Nossos resultados descrevem pela primeira vez o uso do Etodolac em células de LLA Prec.-B. O tratamento com esse fármaco induziu diminuição considerável da sobrevivência celular e do número de células leucêmicas totais. Os efeitos citotóxicos observados poderiam auxiliar na diminuição da massa tumoral durante

a fase de indução de remissão, cujo período de tratamento visa essencialmente a redução máxima do número de células tumorais. Nossos dados mostraram também que o Etodolac induziu diminuição dramática da proliferação celular, evidenciado pela redução do percentual de células em S/G2/M após o tratamento.

Apesar desse efeito citoestático ser desejável para bloquear a expansão tumoral, o bloqueio de ciclo celular pode ter importantes conseqüências no manejo clínico da doença. Uma vez que a quimioterapia convencional é preferencialmente dirigida a células em estágio proliferativo, o uso do Etodolac pode reduzir a eficácia dessas drogas, prejudicando a eficiência do tratamento. Uma alternativa otimizada seria fazer uso do Etodolac nos primeiros sete dias de tratamento. A maioria dos protocolos terapêuticos de LLA Prec.-B recomenda apenas a administração de prednisona ou dexametasona durante esse período de tempo (ARICÒ *et al*, 2005; CONTER *et al*, 2000; SCHRAPPE *et al*, 2000). Uma vez que esses fármacos são independentes de ciclo celular, eles poderiam ser combinados com Etodolac, que auxiliaria na redução da massa tumoral e, conseqüentemente, induziria a entrada em ciclo celular das células leucêmicas dormentes.

Nós demonstramos também que os efeitos citotóxicos e citoestáticos do Etodolac não foram mediados pela enzima COX-II, uma vez que o tratamento com o agente NS-398, inibidor específico dessa enzima, não teve efeito na sobrevivência celular nem no ciclo celular. No entanto, o mecanismo de atuação de Etodolac ainda permanece desconhecido. Uma possibilidade seria através do receptor de PPAR- γ , que recentemente foi identificado em células de LLA Prec.-B e o mesmo grupo mostrou que o tratamento com ligantes de PPAR γ induz inibição do crescimento celular e apoptose (ZANG *et al*, 2004). Ainda assim, são necessários novos estudos que foquem em mecanismos independentes de COX-II

para definir os alvos moleculares responsáveis pelos efeitos observados. Estudos *in vivo* e ensaios clínicos também são absolutamente necessários para validar a eficácia e avaliar a segurança da administração desse fármaco para os pacientes de LLA Prec.-B.

7 CONCLUSÕES

1. A linhagem leucêmica Nalm-16 expressa β -catenina total e sua distribuição é predominantemente confinada à membrana celular, resultando em baixos níveis de ativação canônica constitutiva da via de Wnt.
 2. A linhagem Nalm-6 apresenta níveis extremamente baixos de β -catenina total, o que também sugere a baixa atividade canônica constitutiva da via de Wnt.
 3. A ativação canônica da via de Wnt promovida pelo tratamento com Wnt3a induziu morte celular das células leucêmicas. O mesmo efeito citotóxico foi mimetizado pela inibição de GSK-3 β , sugerindo a participação dessa enzima no mecanismo de ação. Em contrapartida, a inibição da via canônica através da incubação com proteínas recombinantes aumentou a sobrevivência das células leucêmicas.
 4. A ativação canônica da via de Wnt induzida pelo tratamento com Wnt3a aumentou a sensibilidade da Nalm-16 ao tratamento quimioterápico com Etoposide. A inibição da via com antagonistas recombinantes, por vez, induziu resistência à quimioterapia com VP-16.
 5. O perfil de expressão gênica das células leucêmicas revelou a expressão de diversos membros da via de Wnt: As linhagens Nalm-16 e Nalm-6 e todas as células CD19⁺ de pacientes expressam transcritos de LEF-1 e Fzd-3,
-

indicando que as células leucêmicas são potencialmente sensíveis à sinalização de Wnt. A presença de transcritos de Wnt3a não foi detectada nas linhagens celulares e nem nas amostras de pacientes testados, corroborando com os dados funcionais que sugerem que Wnt3a seja um fator supressor de tumor na LLA Prec.B. O transcrito de Wnt5a também não foi detectado em nenhuma das amostras analisadas. Os transcritos de Dkk-1, SFRP-1 e SFRP-2 foram identificados de maneira diferencial nas linhagens e nas amostras primárias de pacientes.

6. O tratamento com o antiinflamatório não-esteroidal Etodolac produziu efeito citotóxico e citoestático nas células leucêmicas e esse efeito foi independente da ação da enzima COX-II.
-

8 BIBLIOGRAFIA

ARICÒ, M., CONTER, V., VALSECCHI, M.G., *et al.* Treatment reduction in highly selected standard-risk childhood acute lymphoblastic leukemia. The AIEOP ALL-9501 study. *Haematologica*, 2005, v.90, p.1186-1191

BAIN, B.J. Acute leukaemia In: BAIN, B.J. *Leukaemia diagnosis*, England: London, 1993, cap.1, p.1-43.

BENÉ M.C., MERNIER, M., CASTOLDI, G., FAURE, G.C., KNAPP, W., LUDWIG, W.D., MATTUTES, E., ORFAO; *et al.* Impact of immunophenotyping and management of acute leukemias. *Haematologica*, 1999, v.84, p.1024-1034

BHANOT, P.; BRINK, M.; SAMOS, C.H.; *et al.* A new member of the frizzled family from *Drosophila* functions as a Wingless receptor. *Nature*, 1996, v.382, n.6588, p.225-30.

BOOLBOL, S.K.; DANNENBERG, A.J.; CHADBURN, A; *et al.* Cyclooxygenase-2 overexpression and tumor formation are blocked by sulindac in a murine model of familial adenomatous polyposis. *Cancer Research*, 1996, v.56, p. 2556-2560.

BRABLETZ, T.; JUNG, A.; REU, S.; *et al.* Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001, v.98, p.10356-10361

BRUCE, W.R.; MEEKER, B.E.; VALERIOTE, F.A. Comparison of the sensitivity of normal hematopoietic and transplanted lymphoma colony-forming cells to chemotherapeutic agents administered in vivo. *Journal of the National Cancer Institute*, 1966, v.37, n.2, p.233-245

BRUSERUD, Ø.; GLENJEN, N.; RYNINGEN, A.; *et al.* In vitro culture of human acute lymphoblastic leukemia (ALL) cells in serum-free media; a comparison of native ALL blasts, ALL cell lines and virus-transformed B cell lines. *Leukemia Research*, 2003, v.27, n.5, p.455-464

BURJANIVOVA, T.; MADZO, J.; MUZIKOVAm K.; *et al.* Prenatal origin of childhood AML occurs less frequently than in childhood ALL. *BMC Cancer*, 2006, n.6:100

CABRERA, C.V.; ALONSO, M.C.; JOHNSTON, P.; *et al.* Phenocopies induced with antisense RNA identify the *wingless* gene. *Cell*, 1987, v. 50, p. 659–663

CHABNER, B.A.; JUNIOR-ROBERTS, T.G. Chemotherapy and the war on cancer. *Nature Cancer Reviews*, 2005, v.5, p.65-72

CHUNG, E.J.; HWANG, S.G.; NGUYEN, P.; *et al.* Regulation of leukemic cell adhesion, proliferation, and survival by beta-catenin. : *Blood*, 2002, v.100, n.3, p.982-990

CONTER, V., ARICÒ, M., VALSECCHI, M.G., *et al.* Long-term results of the Italian Association of Pediatric Hematology and Oncology (AIEOP) Acute Lymphoblastic Leukemia Studies, 1982-1995. *Leukemia*, 2000, v.14, p.2196-2204

COX, C.V.; EVELY, R.S.; OAKHILL, A.; *et al.* Characterization of acute lymphoblastic leukemia progenitor cells. *Blood*, 2004, v104, n.9, p.2919-25.

DALTON, W.S. The tumor microenvironment: focus on myeloma. *Cancer Treatment Review*, 2003, v.29 Suppl 1, p.11-19

DANIELS, D.L.; WEIS, W.I. Beta-catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt-mediated transcription activation. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2005, v.12, n.4, p.364-71.

DE TONI, F.; RACAUD-SULTAN, C.; CHICANNE, G.; *et al.* A crosstalk between the Wnt and the adhesion-dependent signaling pathways governs the chemosensitivity of acute myeloid leukemia. *Oncogene*, 2006, v.25, n.22, p3113-3122

DEMERSON, C.A.; HUMBER, L.G.; ABRAHAM, N.A.; *et al.* Resolution of etodolac and antiinflammatory and prostaglandin synthetase inhibiting properties of the enantiomers. *Journal of Medical Chemistry*, 1983, v.26, p. 1778-1780.

DERKSEN, P.W.; TJIN, E.; MEIJER, H.P.; *et al.* Illegitimate WNT signaling promotes proliferation of multiple myeloma cells. *Proceedings of the National*

Academy of Sciences, 2004, v.101, n.16, p.6122-6127.

DING, H.; HAN, C.; ZHU, J.; *et al.* Celecoxib derivatives induce apoptosis via the disruption of mitochondrial membrane potential and activation of caspase 9. *International Journal of Cancer*, 2004, v. 113, p. 803-810.

DUBOIS RN, TSUJII M, BISHOP P; *et al.* Cloning and characterization of a growth factor-inducible cyclooxygenase gene from rat intestinal epithelial cells. *American Journal of Physiology*, 1994a, v.266, p. 822-827.

DUBOIS, R.N.; AWAD, J.; MORROW, J.; *et al.* Regulation of eicosanoid production and mitogenesis in rat intestinal epithelial cells by transforming growth factor-alpha and phorbol ester. *Journal of Clinical Investigation*, 1994b, 93, p.493-498.

EHRlich, P. *Experimental Researches on specific Therapy. On Immunity with special Reference to the relationship between distribution and action of antigens.* *Journal of the Royal Institute of Public Health*, 1907, 15: 321-340

ETHERIDGE, S.L., SPENCER, G.J., HEATH, D.J. & GENEVER, P.G. Expression Profiling and Functional Analysis of Wnt Signaling Mechanisms in Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells*, 2004, v.22, p.849-860

FENG, R.; ANDERSON, G.; XIAO, G.; *et al.* SDX-308, a nonsteroidal anti-inflammatory agent, inhibits NF-kappaB activity, resulting in strong inhibition of

osteoclast formation/activity and multiple myeloma cell growth. *Blood*, 2007, v.109, n.5, p.2130-2138.

FIDLER, I.J.; WILMANN, C.; STAROSELKY, A.; *et al.* Modulation of tumor cell response to chemotherapy by the organ environment. *Cancer Metastasis Review*, 1994, v.13, n.2, p.209-222.

FISHER, D.E. Apoptosis in cancer therapy: Crossing the threshold. *Cell*, 1994, v.78, p. 539-542.

FOON, K.A.; TODD R.F. Immunologic Classification of Leukemia and Lymphoma. *Blood*, v.68, n.1, p.1-31, 1986

FORDE, J.E.; DALE, T.C. Glycogen synthase kinase 3: a key regulator of cellular fate. *Cellular and Molecular Life Science.*, 2007, v.64, p.1930-1944

FORGET, M.A.; TURCOTTE, S.; BEAUSEIGLE, D.; *et al.* The Wnt pathway regulator DKK1 is preferentially expressed in hormone-resistant breast tumours and in some common cancer types. *British Journal of Cancer.*, 2007, v.96, n.4, p.646-653.

FORTNEY, J.E.; ZHAO, W.; WENGER, S.L.; *et al.* Bone marrow stromal cells regulate caspase 3 activity in leukemic cells during chemotherapy. *Leukemia Research*, 2001, v.25, n.10, p.901-907

FUERER, C.; NUSSE, R.; TEN BERGE, D. Wnt signalling in development and disease. Max Delbrück Center for Molecular Medicine meeting on Wnt Signaling in Development and Disease. EMBO Reports, 2008, v.9, n.2, p.134-138

GALE, K.B.; FORD, A.M.; REPP, R; *et al.* Backtracking leukemia to birth: identification of clonotypic gene fusion sequences in neonatal blood spots. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1997, v.94, n.25,p.13950-13954

GAO, F.; NORDIN, P.; KRANTZ, I.; *et al.* Variation in the seasonal diagnosis of acute lymphoblastic leukemia: evidence from Singapore, the United States, and Sweden. American Journal of Epidemiology, 2005, v.162, n.8, p.753-763

GESKE, F.J.; MONKS, J.; LEHMAN, L.; *et al.* The role of the macrophage in apoptosis: hunter, gatherer, and regulator. International Journal of Hematology, 2002, v.76, p.16-26.

GIARDIELLO, F.M.; HAMILTON, S.R.; KRUSH, A.J.; *et al.* Treatment of colonic and rectal adenomas with sulindac in familial adenomatous polyposis. New England Journal of Medicine, 1993, v.328, n.18, p.1313-1316

GIBSON, L.F. Survival of B lineage leukemic cells: signals from the bone marrow microenvironment. Leukemia & Lymphoma, 2002, v.43, n.1, p.19-27

GILMAN, A. The initial clinical trial of nitrogen mustard. *American Journal of Surgery*, 1963, v.105, p.574-578

GLINKA, A.; WU, W.; DELIUS, H., *et al.* Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. *Nature*, 1998, v.391, n.6665, p.357-362

GOLIAS, C.H.; CHARALABOPOULOS, A.; CHARALABOPOULOS, K. Cell proliferation and cell cycle control: a mini review. *International Journal of Clinical Practice*, 2004, v.58, n.12, p.1134-1141

GORDON, M.D.; NUSSE R. Wnt Signaling: Multiple Pathways, Multiple Receptors, and Multiple Transcription Factors. *The Journal Of biological Chemistry*, 2006, v.281, N. 32, p. 22429–22433

GOTTARDI, C.J.; WONG, E.; GUMBINER, B.M. E-cadherin suppresses cellular transformation by inhibiting beta-catenin signaling in an adhesion-independent manner. *Journal of Cell Biology*, 2001, v.153, n.5, p.1049-1060

GREAVES M. A natural history for pediatric acute leukemia. *Blood*, 1993, v.82, p.1043-1051.

HANAHAN D.; WEINBERG, R.A. The hallmarks of cancer. *Cell*, 2000, v.7, p.57-70

HIROTA, C.; IIDA, M.; AOYAGI, K.; *et al.* Effect of indomethacin suppositories on rectal polyposis in patients with familial adenomatous polyposis. *Cancer*, 1996, v.78, n.8, p.1660-1665

HOANG, B.H.; KUBO, T.; HEALEY, J.H.; *et al.* Dickkopf 3 inhibits invasion and motility of Saos-2 osteosarcoma cells by modulating the Wnt-beta-catenin pathway. *Cancer Research*, 2004, v.64, n.8, p.2734-2739.

INSEL, P.A. Analgesic-antipyretics and anti-inflammatory agents: drugs employed in the treatment of rheumatoid arthritis and gout In: Gilman AG, Rall TW, Nies AS, Taylor P, eds. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 8th edn. New York: Pergamon Press, 1990: 638-681.

ISRAELS, E.D.; ISRAELS, L.G. The cell cycle. *Stem Cells*, 2001, v.19, n.1, p.88-91.

ISRAELS, L.G.; ISRAELS, E.D. Apoptosis. *Stem Cells*, 1999, v.17, n.5, p.306-313

IWAMOTO, S.; MIHARA, K.; DOWNING, J.R.; *et al.* Mesenchymal cells regulate the response of acute lymphoblastic leukemia cells to asparaginase. *Journal of Clinical Investigation*, 2007, v.117, n.4, p.1049-1057

JACOBY, R.F.; MARSHALL, D.J.; NEWTON, M.A.; *et al.* Chemoprevention of spontaneous intestinal adenomas in the Apc Min mouse by

the nonsteroidal anti-inflammatory drug piroxicam. *Cancer Research*, 1996, v.56, p. 710-714.

JENSEN, M.; ENGERT, A.; WEISSINGER, F.; *et al.* Phase I study of a novel pro-apoptotic drug R-etodolac in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Investigational New Drugs*, 2007, v. EPUD AHEAD

JIANMING, Y., HONGYU, L., YUN-WEN, C., GOPESH, S., ZIFEN, G. & QIAN, T. WNT5A is epigenetically silenced in hematologic malignancies and inhibits leukaemia cell growth as a tumor suppressor, *Blood*, 2007, v.110, p.4130-4131

KARIMI, M; YARMOHAMMADI, H. Seasonal variations in the onset of childhood leukemia/lymphoma: April 1996 to March 2000. *Hematological Oncology*, 2003, v.21, n.2, p.51-55

Karpnich, N.O.; Tafani, M.; Rothman, R.J.; *et al.* The course of etoposide-induced apoptosis from damage to DNA and p53 activation to mitochondrial release of cytochrome c. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, v.277, n.19, p.16547-16552.

KASUM, C.M.; BLAIR, C.K.; FOLSOM, A.R.; *et al.* Non-steroidal Anti-inflammatory Drug Use and Risk of Adult Leukemia. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 2003, v.12, p. 534-537.

KEER, J.F.R.; WVLLIE A.H.; CURRIE A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 1972, v.26, n.4, p. 239-257

KERSEY, J.H. Fifty years of studies of the biology and therapy of childhood leukemia. *Blood*, 1997, v.90, p.4243-4251.

KHAN, N.I., BRADSTOCK, K.F. & BENDALL, L.J. Activation of Wnt/beta-catenin pathway mediates growth and survival in B-cell progenitor acute lymphoblastic leukaemia. *British Journal of Haematology*, 2007, v.138, p.338-348

KHAN, N.I.; BRADSTOCK, K.F.; BENDALL, L.J. Activation of Wnt/beta-catenin pathway mediates growth and survival in B-cell progenitor acute lymphoblastic leukaemia. *British Journal of Haematology*, 2007, v.138, n.3, p.338-348

KIM, K., PANG, K.M., EVANS, M. & HAY, E.D. Overexpression of beta-catenin induces apoptosis independent of its transactivation function with LEF-1 or the involvement of major G1 cell cycle regulators. *Molecular Biology of the Cell*, 2000; v.11, p.3509-3523

KIM, R.; TANABE, K.; UCHIDA, Y; *et al.* Current status of the molecular mechanisms of anticancer drug-induced apoptosis. The contribution of molecular-level analysis to cancer chemotherapy. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 2002, v.50, n.5, p.343-52.

KINLEN, L.J. Evidence for an infective cause of childhood leukaemia: comparison of a Scottish new town with nuclear reprocessing sites in Britain. *Lancet*, 1988, v.322, n.8624, p.1323-1327

KNUDSON AG. Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nature Reviews Cancer*, 2001, v.1, n.2, p.157-62.

KONOPLEVA, M.; KONOPLEV, S.; HU, W.; *et al.* Stromal cells prevent apoptosis of AML cells by up-regulation of anti-apoptotic proteins. *Leukemia*, 2002, v.16, n.9, p.1713-24

KOOPMAN, G.; REUTELINGSPERGER, C.P.; KUIJTEN, G.A.; *et al.* Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*, 1994, v.84, n.5, p.1415-1420

KRUH, G.D. Introduction to resistance to anticancer agents. *Oncogene*, 2003, v.22, n.47, p7262-7264.

KUHL, M. Non-canonical wnt signaling in xenopus: regulation of axis formation and gastrulation. *Seminar in Cell and Development Biology*, 2002, v.13, n.3, p.243-249

KUHL, M., SHELDAHL, L.C., PARK, M., *et al.* The Wnt/Ca²⁺ pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape. *Trends in Genetics*, 2000, v.16, p.279–283.

KUMAN V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N. Adaptação, Dano e Morte Celular. In: Kuman V.; Abbas, A.K.; Fausto, N. Robbins & Cotran. Patologia- Bases Patológicas das Doenças. Rio de Janeiro, 2005, p.3-48

KUNE ,G.A.; KUNE, S.; WATSON, L.F. Colorectal cancer risk, chronic illnesses, operations and medications: case–control results from the Melbourne Colorectal Cancer Study. Cancer Research, 1988, v. 48, p. 4399-4404.

HARKER, W.G.; WARD, J.H.; STEWART, J.R. In: LEE, G.R.; BITHELL, T.C.; FOERSTER, J.; LUKENS, J.N.; ATHENS, J.W. WINTROBE'S Clinical Hematology. London, 1993, p.1843-1872

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry, 1951, v.193, p.265-275

LU, D.; ZHAO, Y.; TAWATAO, R.; *et al.* Activation of the Wnt signaling pathway in chronic lymphocytic leukemia. . Proceedings of the National Academy of Sciences, 2004, v.101, n.9, p.3118-3123.

MACKENZIE, J.; GALLAGHER, A.; CLAYTON, R.A.; *et al.* Screening for herpesvirus genomes in common acute lymphoblastic leukemia. Leukemia, 2001, v.15, n.3, p.415-421

MANABE, A.; COUSTAN-SMITH, E.; BEHM, F.G.; *et al.* Bone marrow-derived stromal cells prevent apoptotic cell death in B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 1992, v.79, n.9, p.2370-2377

MANABE, A.; MURTI, K.G.; COUSTAN-SMITH, E.; *et al.* Adhesion-dependent survival of normal and leukemic human B lymphoblasts on bone marrow stromal cells. *Blood*, 1994, v.83, n.3, p.758-766

MARNETT, L.J. Aspirin and the potential role of prostaglandins in colon cancer. *Cancer Research*, 1992; 52: 5575-5589.

MATSUO, Y.; DREXLER, H.G. Establishment and characterization of human B cell precursor-leukemia cell lines. *Leukemia Research*, 1998; v.22, p.567-579

MCWHIRTER, J.R.; NEUTEBOOM, S.T.; WANCEWICZ, E.V.; *et al.* Oncogenic homeodomain transcription factor E2A-Pbx1 activates a novel WNT gene in pre-B acute lymphoblastoid leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1999, v.96, n.20, p.11464-11469.

MORI, H.; COLMAN, S.M.; XIAO Z.; *et al.* Chromosome translocations and covert leukemic clones are generated during normal fetal development. . *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2002, v.99, n.12, p.8242-8247

MORIN, P.J.; SPARKS, A.B.; KORINEK, V.; *et al.* Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. : Science, 1997, v.275, n.5307, p.1787-1790

MUDRY, R.E.; FORTNEY, J.E.; YORK, T.; *et al.* Stromal cells regulate survival of B-lineage leukemic cells during chemotherapy. Blood, 2000, v.96, n.5, p.1926-1932

MULLIGHAN, C.G.; GOORHA, S.; RADTKE, I.; *et al.* Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. Nature, 2007, v.446, n.7137, p.758-764

NISHIGAKI, H.; ITO, C.; MANABE, A.; KUMAGAI, M. *et al.* Prevalence and growth characteristics of malignant stem cells in B-lineage acute lymphoblastic leukemia. Blood, 1997, v.89, n.10, p.3735-3744

NUSSE R.; VARMUS H.E. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. Cell, 1982, v.31, p. 99–109

NYGREN, M.K.; DØSEN, G.; HYSTAD, M.E.; *et al.* Wnt3A activates canonical Wnt signalling in acute lymphoblastic leukaemia (ALL) cells and inhibits the proliferation of B-ALL cell lines. British Journal of Haematology, 2007, v.136, n.3, p.400-413

OHIGASHI, T.; MIZUNO, R.; NAKASHIMA, J.; *et al.* Inhibition of Wnt signaling downregulates Akt activity and induces chemosensitivity in PTEN-mutated prostate cancer cells. *Prostate*, 2005, v.62, n.1, p.61-68

PARK, C.H.; BERGSAGEL, D.E.; MCCULLOCH, E.A. Mouse myeloma tumor stem cells: a primary cell culture assay. *Journal of National Cancer Institute*, 1971, v.46, n.2, p.411-22.

PASSEGUÉ, E.; JAMIESON, C.H.; AILLES, L.E.; *et al.* Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? . *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2003, v.100, suppl. 1, p.11842-9

PLATT, N.; DA SILVA, R.P.; GORDON, S. Recognizing death: the phagocytosis of apoptotic cells. *Trends in Cell Biology*, 1998, v.8, n.9, p.365-372

PUI, C-H. Acute lymphoblastic leukemia. *Pediatric Clinics of North America*, 1997, v.44, n.4. p.831-846

RADL, J.; CROESE, J.W.; ZURCHER, C.; *et al.* Animal model of human disease. Multiple myeloma. *American Journal of Pathology*, 1988, v.132, p.593-597.

RAO, C.V.; RIVENSON, A.; SIMI, B.; *et al.* Chemoprevention of colon carcinogenesis by sulindac, a nonsteroidal anti-inflammatory agent. *Cancer Research*, 1995, v.55, p.1464-1472.

RIBEIRO, R. Leucemia linfóide aguda na infância e adolescência. In: ZAGO, M.A., FALCÃO R.P., PASQUINI, R. Hematologia. Fundamentos e Prática. São Paulo, 2004, p.487-518.

RIJSEWIJK, F.; SCHUERMANN, M.; WAGENAAR, E.; et al. The *Drosophila* homolog of the mouse mammary oncogene *int-1* is identical to the segment polarity gene *wingless*. *Cell*, 1987, v. 50, p. 649–657

RIVERA, G.K.; PINKELM D.; SIMONE, J.V.; *et al.* Treatment of acute lymphoblastic leukemia. 30 years' experience at St. Jude Children's Research Hospital. *New England Journal of Medicine*, 1993, v.329, p.1289-1295.

ROSENBERG, L.; PALMER, J.R.; ZAUBER, A.G.; et al. A Hypothesis: Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs Reduce the Incidence of Large-Bowel Cancer. *Journal of National Cancer Institute*, 1991, v.83, p. 355-358.

RUBNITZ, J.E.; PUI, C.H. Recent advances in the treatment and understanding of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Cancer Treatment Review*, 2003, v.29, n.1, p.31-44

SCHIMMER, A.D.; HEDLEY, D.W.; PENN, L.Z.; *et al.* Receptor- and mitochondrial-mediated apoptosis in acute leukemia: a translational view. *Blood*, 2001, v.98, n.13, p.3541-53

SCHRAPPE, M., REITER, A., LUDWIG, W.D., *et al.* Improved outcome in

childhood acute lymphoblastic leukemia despite reduced use of anthracyclines and cranial radiotherapy: results of trial ALL-BFM 90. German-Austrian-Swiss ALL-BFM Study Group. *Blood*, 2000, v.95, p.3310-3322

SCHREINEMACHERS, D.M.; EVERSON, R.B. Aspirin use and lung, colon, and breast cancer incidence in a prospective study. *Epidemiology*, 1994, v.5, p.138-146.

SERINSÖZ, E.; NEUSCH, M.; BÜSCHE, G.; *et al.* Aberrant expression of beta-catenin discriminates acute myeloid leukaemia from acute lymphoblastic leukaemia. *British Journal of Haematology*, 2004, v.126, n.3, p.313-319

SHATTUCK-BRANDT, R.L.; VARILEK, G.W.; RADHIKA, A.; *et al.* Cyclooxygenase 2 expression is increased in the stroma of colon carcinomas from IL-10(-/-) mice. *Gastroenterology*, 2000, v.118, p. 337-345.

SHIH, I.M.; YU, J.; HE, T.C.; *et al.* The beta-catenin binding domain of adenomatous polyposis coli is sufficient for tumor suppression. *Cancer Research*, 2000, v.60, n.6, p.1671-1676

SHOU, J.; ALI-OSMAN, F.; MULTANI, A.S.; *et al.* Human Dkk-1, a gene encoding a Wnt antagonist, responds to DNA damage and its overexpression sensitizes brain tumor cells to apoptosis following alkylation damage of DNA. *Oncogene*, 2002, v.21, n.6, p.878-889

SMITH, M.L.; HAWCROFT, G.; HULL, M.A. The effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on human colorectal cancer cells: evidence of different mechanisms of action. *European Journal of Cancer*, 2000, v.36, n.5, p 664-674.

SPIELGELMAN, B.M. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma: A key regulator of adipogenesis and systemic insulin sensitivity. *European Journal of Medical Research*, 1997, v.2, p. 457-464.

STYCZYNSKI, J.; WYSOCKI, M.; DEBSKI, R.; *et al.* Predictive value of multidrug resistance proteins and cellular drug resistance in childhood relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 2007, v.133, n.11, p.875-893.

SUTHERLAND, H.J.; BLAIR, A.; ZAPF, R.W. Characterization of a hierarchy in human acute myeloid leukemia progenitor cells. *Blood*, 1996, v.87, n.11, p.4754-61

SUZUKI, H.; WATKINS, D.N.; JAIR, K.W.; *et al.* Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive WNT signaling in colorectal cancer. *Nature Genetics*, 2004, v.36, n.4, p.417-422.

TABAK, D. Quimioterapia e Radioterapia. In: ZAGO, M.A., FALCÃO R.P., PASQUINI, R. Hematologia. Fundamentos e Prática. São Paulo, 2004, p.403-412.

TAMAI, K., SEMENOV, M., KATO, Y., *et al.* LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature*, 2000, v. 407, p.530–535

TAYLOR, G.M.; DEARDEN, S.; PAYNE, N.; *et al.* Evidence that an HLA-DQA1-DQB1 haplotype influences susceptibility to childhood common acute lymphoblastic leukaemia in boys provides further support for an infection-related aetiology. *British Journal of Cancer*, 1998, v.78, n.5,p.561-565

TEGEDER, I.; PFEILSCHIFTER, J.; GEISLINGER, G. Cyclooxygenase-independent actions of cyclooxygenase inhibitors *FASEB Journal*, 2001, v.15, p.2057-2072.

TOPOL, L., JIANG, X., CHOI, H., *et al.* Wnt-5a inhibits the canonical Wnt pathway by promoting GSK-3-independent beta-catenin degradation. *The Journal of Cell Biology*, 2003, v.162, p.899-908.

VAN GIJN, M.E., SNEL, F., CLEUTJENS, J.P.M., SMITS, J.F.M. & BLANKESTEIJN, W.N. Overexpression of Components of the Frizzled-Dishevelled Cascade Results in Apoptotic Cell Death, Mediated by β -Catenin. *Experimental Cell Research*, 2001, v.265, p.46-53.

VAN OOYEN, A.; NUSSE R. Structure and nucleotide sequence of the putative mammary oncogene int-1; proviral insertions leave the protein-encoding domain intact. *Cell*, Cambridge, 1984, v.39, p. 233–240.

VANE, J.R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature*, 1971, v.231, p. 232-235.

VEEMAN, M.T., AXELROD, J.D., AND MOON, R.T. A second canon. Functions and mechanisms of β -catenin-independent Wnt signaling. *Developmental Cell*, 2003, v.5, p.367–377.

VETTER, G.; PLACCHI, M.; JOUBERT, L. Comparative efficacy of etodolac and placebo in rheumatoid arthritic patients. *International Journal of Clinical Pharmacology, Therapy and Toxicology*, 1982, v.20, p. 240-5.

VIANA, M.B. Leucemias e linfomas pediátricos. In: MURAD, A.M. Bases clínicas do tratamento. Rio de Janeiro, 1996, p.372-383

VINDELOV, L.L.; CHRISTENSEN, I.; NISSEN, N.A. Detergent-trypsin method for the preparation of nuclei for flow cytometry. *Cytometry*, 1983; v.3, p.323-327.

VOGT, T.; MCCLELLAND, M.; JUNG, B.; et al. Progression and NSAID-induced apoptosis in malignant melanomas are independent of cyclooxygenase II. *Melanoma Research*, 2001, v.11, p. 587-599.

WEHRLI, M., DOUGAN, S. T., CALDWELL, K., et al. Arrow encodes an LDL-receptor-related protein essential for Wingless signalling. *Nature*, 2000, v.407, p;527–530

WIEMELS, J.L.; XIAO, Z.; BUFFLERm P.A.; *et al.* In utero origin of t(8;21) AML1-ETO translocations in childhood acute myeloid leukemia. *Blood*,

2002, v.99, n.10, p3801-3805

XIE, W.L.; CHIPMAN, J.G.; ROBERTSON, D.L.; *et al.* Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1991, 88, p. 2692-2696.

YOGANATHAN, T.N.; COSTELLO, P.; CHEN, X.; *et al.* Integrin-linked kinase (ILK): a hot therapeutic target. *Biochemical Pharmacology*, 2000, v.60, n.8, p.1115-1159

ZANG, C.; LIU, H.; POSCH, M.G.; WAECHTER, M.; *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands induce growth inhibition and apoptosis of human B lymphocytic leukemia. *Leukemia Research*, 2004, v.28, n.4, p. 387-97

ZHAO, C.; BLUM, J.; CHEN, A.; *et al.* Loss of beta-catenin impairs the renewal of normal and CML stem cells in vivo. *Cancer Cell*, 2007, v.12, n.6, p.528-541

ZHU, Y.M.; FORONI, L.; MCQUAKER, I.G.; *et al.* Mechanisms of relapse in acute leukaemia: involvement of p53 mutated subclones in disease progression in acute lymphoblastic leukaemia. : *British Journal of Cancer*, 1999, v.79, p.1151-1157

ANEXO 1



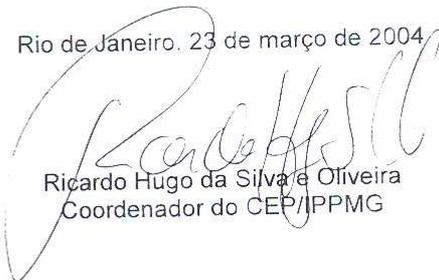
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO DE JANEIRO UFRJ

INSTITUTO DE PUERICULTURA E PEDIATRIA MARTAGÃO GESTEIRA

MEMORANDO DE APROVAÇÃO

O projeto "Papel da via de sinalização de Wnt na modulação da proliferação e sobrevivência de células de leucemia linfocítica aguda-B", sob a responsabilidade do Dr. Leandro de Souza Thiago, foi analisado pelo CEP/IPPMG e aprovado em 23 de março de 2004.

Rio de Janeiro, 23 de março de 2004


Ricardo Hugo da Silva e Oliveira
Coordenador do CEP/IPPMG



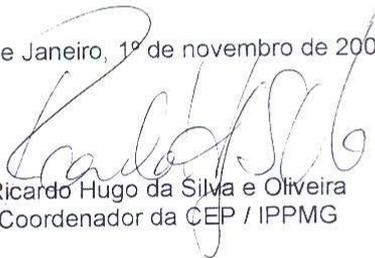
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO DE JANEIRO UFRJ

INSTITUTO DE PUERICULTURA E PEDIATRIA MARTAGÃO GESTEIRA

MEMORANDO DE APROVAÇÃO

O projeto "Estudo descritivo de um caso de leucemia bifenotípica de células T e B.", de responsabilidade do Dr. Leandro de Souza Thiago, foi analisado pelo CEP/IPPMG e aprovado em 1º de novembro de 2005.

Rio de Janeiro, 1º de novembro de 2005


Ricardo Hugo da Silva e Oliveira
Coordenador da CEP / IPPMG

ANEXO 2

LETTER TO THE EDITOR

An Uncommon Case of Childhood Biphenotypic Precursor-B/T Acute Lymphoblastic Leukemia

To the Editor: Biphenotypic acute leukemia (BAL) is characterized by the expression of markers associated with two or more different hematopoietic cell lineages in the blast cell population [1]. In most cases, a myeloid/B-cell lineage or a myeloid/T-cell phenotype is observed in association with a poor clinical outcome. In contrast, BAL showing a B-/T-cell phenotype is extremely rare and there is little information concerning the clinical management of these patients. Only recently, a 70-year-old case with a B-/T-cell BAL was published [2].

A 10-month-old child was admitted with marked pallor, hepatosplenomegaly, and petechiae. The white blood cell count was of $13.8 \times 10^9/L$ with 25% lymphoblasts. Hemoglobin levels were of 6 g/dl and the platelet count was of $22 \times 10^9/L$. Spinal fluid cell count and biochemical analyses were within the normal range, except for serum LDH that was increased (619 g/dl).

Morphological analysis of bone marrow aspirate showed 85% leukemic blast cells. Immunophenotypic analysis revealed one biphenotypic B/T blast population (cyCD3⁺/CD5⁺/CD19⁺/CD79a⁺/HLADR^{-/+}/CD10⁻/CD20^{-/+}/CD22⁺/CD7^{-/+}/CD33⁻/CD34⁻/CD2⁻/TdT^{-/+}/IgM⁻/MPO⁻/CD4⁻/CD8⁻) consistent with BAL (Fig. 1). Conventional cytogenetics showed: 46,XY[6]/46,XYdel(6)(q21)[4]. The patient was considered as a high-risk ALL due to the lack of information about B-/T-cell ALL in infancy and treated with a modified ALL-BFM-95 protocol (HD-MTX-2 g/m²). At day +8 of therapy, he showed good response to prednisone according to the ALL-BFM criteria and at day +15 after induction therapy, another BM aspirate was performed showing 6% B-/T-lymphoblasts. On day +33 of induction, complete morphological remission (CR) was obtained; the patient has remained in continuous CR after a follow-up of 38 months.

Although many ALL cases co-expressing B- and T-cell-associated lymphoid markers have been previously described [3], here we report an infant suffering from a BAL with a B/T phenotype according to the EGIL criteria [4]. Leukemic cells from this patient scored 6.5 points for B-lineage and four points for T-cell-associated antigens. A previous cohort of 2,055 children with ALL had a frequency of cases showing a CD19⁺/CD2⁺ phenotype of 4%, and only one case corresponded to an infant [3]. Using the EGIL criteria, CD19 and CD2 expression is not sufficient to define a case as BAL. Unfortunately, in the referred cohort no further information was provided about the expression of other T- and B-cell-associated markers [3]. Despite the frequency of MLL rearrangements in infants, the case reported here did not have this alteration. In contrast, he had del(6q21), whose prognostic impact remains unknown. In contrast to what has been reported in ALL in infants, the patient presented here showed a good response to therapy and has been in continuous CR for more than 3 years.

ACKNOWLEDGMENT

This work has been partially supported by grants from Programa Hispano-Brasileño de Cooperación Universitaria Ref.

© 2007 Wiley-Liss, Inc.
DOI 10.1002/pbc.21290

PHB 2004-0800-PC (Ministerio de Educación y Ciencia), Madrid, Spain and CAPES/Ministério da Educação, Brasília, Brazil. This work has been partially supported by grants from CNPq/Ministério de Ciência e Tecnologia, Brasília, Brazil, CAPES/Ministério da Educação, Brasília, Brazil, Rio de Janeiro Cell Bank/APABCAM, Rio de Janeiro, Brazil.

REFERENCES

- Matutes E, Morilla R, Farhat N, et al. Definition of acute biphenotypic leukemia. *Haematologica* 1997; 82: 64–66.
- Lau LG, Tan LK, Koay ES, et al. Acute lymphoblastic leukemia with the phenotype of a putative B-cell/T-cell bipotential precursor. *Am J Hematol* 2004; 77: 156–160.
- Uekun FM, Gaynon P, Sather H, et al. Clinical features and treatment outcome of children with biphenotypic CD2⁺CD19⁺ acute lymphoblastic leukemia: A Children's Cancer Group Study. *Blood* 1997; 89: 2488–2493.
- Béné MC, Castoldi GL, Knapp W, et al. (on behalf of EGIL). Proposals for the immunological classification of leukaemias. *Leukemia* 1995; 9: 1783–1786.

Elaine S. Costa, MD, PhD*
Instituto de Pediatria e Puericultura Martagão Gesteira
and Departamento de Clínica Médica
Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ)
Rio de Janeiro, Brazil

Leandro S. Thiago, BSc
Hospital Universitário Clementino Fraga Filho
and Departamento de Histologia e Embriologia
Instituto de Ciências Biomédicas
Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Brazil

Elaine S. Costa and Leandro S. Thiago contributed equally to this work.

Grant sponsor: Programa Hispano-Brasileño de Cooperación Universitaria (Ministerio de Educación y Ciencia), Madrid, Spain; Grant number: Ref. PHB 2004-0800-PC; Grant sponsor: CAPES/Ministério da Educação, Brasília, Brazil; Grant sponsor: CNPq/Ministério de Ciência e Tecnologia, Brasília, Brazil; Grant sponsor: CAPES/Ministério da Educação, Brasília, Brazil; Grant sponsor: Rio de Janeiro Cell Bank/APABCAM, Rio de Janeiro, Brazil; Grant sponsor: FAPERJ, Rio de Janeiro, Brazil.

*Correspondence to: Elaine S. Costa, Pediatrics Oncohematology Service, Instituto de Pediatria e Puericultura Martagão Gesteira, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Av. Brigadeiro Trompowski, s/n, Cidade Universitária, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro 21941-970, Brazil. E-mail: elainesc@centroin.com.br

Received 9 May 2007; Accepted 21 May 2007



2 Costa et al.

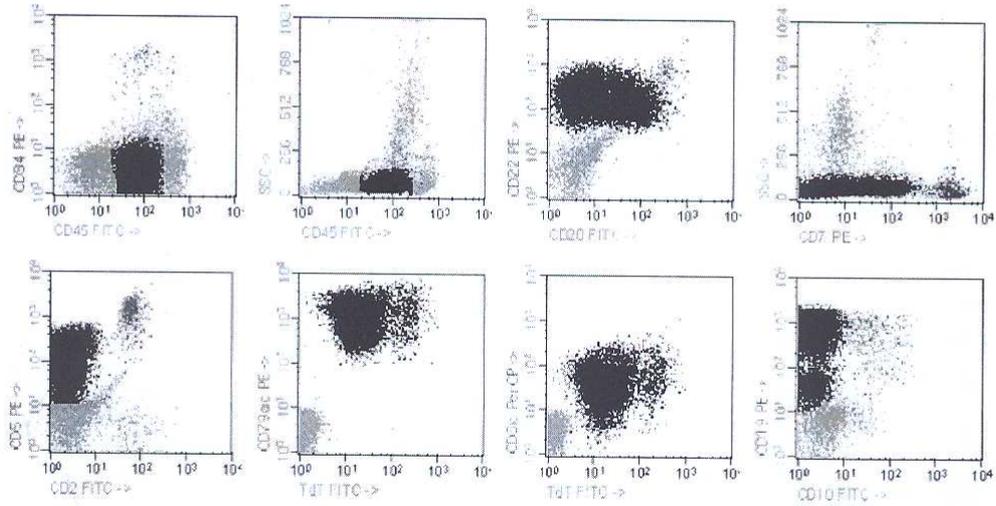


Fig. 1. Immunophenotypic profile of bone marrow blast cells at diagnosis. In all bivariate dot plots shown, the biphenotypic blast cell population is depicted in black, while normal residual hematopoietic cells are displayed as gray events. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

Ivone B. Otazu, PhD
Cytogenetic and Molecular Biology
Rio de Janeiro Cell Bank
Universidade Federal do Rio de Janeiro
(UFRJ), Brazil

Maria H. Ornellas, MD, PhD
Departamento de Patologia
Faculdade de Ciências Médicas
Estadual University of Rio de Janeiro (UERJ), Brazil
Bone Marrow Transplantation Unit (CEMO)
National Institute of Cancer
(INCA), Brazil

Marcelo G. Land, MD, PhD
Instituto de Pediatria e Puericultura Martagão Gesteira
and Departamento de Clínica Médica
Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ)
Rio de Janeiro
Brazil

Alberto Orfao, MD, PhD
Cytometry Service
Department of Medicine and
Cancer Research Center
University of Salamanca
Salamanca, Spain

ANEXO 3

Artigo submetido à publicação**THE WNT SIGNALING PATHWAY REGULATES B-CELL PRECURSOR ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKAEMIA CELL SURVIVAL AND DRUG RESISTANCE****Running title:** Role of Wnt signaling pathway in BCP-ALL

Leandro S. Thiago^{1*}; Elaine S. Costa²; Daiana V. Lopes¹; Ivone B. Otazu^{1, 3}; Alexandre E. Nowill⁴; Fábio A. Mendes⁵; Débora M. Portilho¹; José G. Abreu⁵; Cláudia S. Mermelstein¹; Alberto Orfao⁶, Maria Isabel D. Rossi¹, and Radovan Borojevic¹.

¹Hospital Universitário Clementino Fraga Filho and Departamento de Histologia e Embriologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Brazil.

²Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira and Departamento de Clínica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, Brazil, ³Tawam Hospital-Johns Hopkins Medicine, P.O. Box 15258, Al Ain, Abu Dhabi, United Arab Emirates, ⁴Centro Integrado de Pesquisas Oncohematológicas da Infância (CIPOI), Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP, Campinas, Brazil, ⁵Departamento de Anatomia, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, Brazil. ; ⁶Cytometry Service, Department of Medicine and Cancer Research Center (IBMCC, University of Salamanca-CSIC), University of Salamanca, Salamanca, Spain.

¹E-mail: leandrothiago@terra.com.br

*Corresponding Author and contact information for offprints:

Leandro de Souza Thiago,

Banco de Células do Rio de Janeiro, Hospital Universitário Clementino Fraga Filho 4º andar, sala 4A9, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21941-590 Cidade Universitária, Rio de Janeiro, Brasil

Tel: (55) (21) 2562-2468

Fax: (55) (21) 2562-6483

E-mail address: leandrothiago@terra.com.br

Abstract's Word Count: 179

Paper's Word count: 4131

Abstract

B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia (BCP-ALL) is the most common malignancy in children. The Wnt signaling pathway has been found to be extensively involved in cancer onset and progression but its role in BCP-ALL remains controversial. We evaluate the role of the Wnt pathway in maintenance of BCP-ALL cells and resistance to chemotherapy. Gene expression profile revealed that BCP-ALL cells are potentially sensitive to modulation of Wnt pathway. Nalm-16 and Nalm-6 cell lines displayed low levels of canonical activation, as reflected by the virtually complete absence of total β -catenin in Nalm-6 and the β -catenin cell membrane distribution in Nalm-16 cell line. Canonical activation with Wnt3a induced BCP-ALL cell death. Lithium chloride (LiCl) also induced a cytotoxic effect on leukemic cells. In contrast, both Wnt5a and Dkk-1 increased Nalm-16 cell survival. In turn, Wnt3a enhanced the *in vitro* sensitivity of Nalm-16 to etoposide (VP-16). Conversely, treatment with canonical antagonists protected leukemic cells from chemotherapy-induced cell death. Overall, our results suggest that canonical activation of the Wnt pathway exerts a tumor suppressive effect, thus its inhibition may support BCP-ALL cell survival.

Keywords: B-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukaemia, Apoptosis, Wnt Signaling Pathway, Drug Resistance, Proliferation

Introduction

B-cell precursor Acute lymphoblastic leukaemia (BCP-ALL) is a malignancy characterized by progressive accumulation of immature clonal B cell precursors in the bone marrow (BM). Nowadays, roughly 80% of all newly diagnosed pediatric patients become long-term survivors after adequate multi-agent chemotherapy protocols administered according to the individual patient risk category [1]. However, a subset of children relapses despite this strategy, suggesting that other factors than those currently used to define patients risk could have an impact on the behavior of the disease and response to therapy.

At present, it is well known BM microenvironment plays an essential regulatory role on the proliferation and survival of BCP-ALL neoplastic cells at the same time it represents the primary site for disease relapse [2, 3]. Understanding the specific molecular signaling pathways activated and/or intensified by stromal cells is crucial to be able to disrupt BCP-ALL cell maintenance and abrogate resistance to chemotherapy.

The Wnt signaling is a highly conserved pathway that mediates cell-to-cell communications during embryogenesis. In addition, it is also involved in other relevant cell functions such as cell proliferation, differentiation, migration, cell fate decisions, apoptosis, and stem cell self-renewal [4, 5]. Wnt molecules are secreted lipid-modified cysteine-rich glycoproteins that bind to and signal through Frizzled (Fz) receptors [6]. Different types of Wnt/Fz complexes may signal through the so-called canonical (β -catenin mediated signaling) or non-canonical Wnt pathways (β -catenin-independent signaling). In the canonical pathway, this interaction leads to activation of Dishevelled (Dsh) proteins that block the GSK3-

β kinase activity, required for β -catenin accumulation in the cytoplasm. As a result, cytoplasmic β -catenin is translocated into the nucleus where it converts the TCF/LEF complex from its transcriptional repression form to a transcriptional activating configuration, modulating the expression of several genes involved in different biological phenomena such as those described above [7].

In non-canonical signaling, Wnt agonists such as Wnt5a may stimulate intracellular Ca^{2+} release, activation of protein kinase C (PKC) and Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase II (CaMKII), or they may inhibit the canonical pathway through degradation of β -catenin [8, 9].

Deregulation of the Wnt signaling pathway has been extensively found to be involved in cancer onset and progression [10-12]. In recent years, several reports have shown that members of the Wnt pathway could be involved in regulating cell proliferation and survival in different hematological malignancies [13-15]. However, more recent data indicates that antagonists of the Wnt pathway may increase tumor cell growth [16, 17] and sensitivity to chemotherapy [18, 19] depending on the model studied. In fact, at present no consensus exists on the precise role of the Wnt pathway in BCP-ALL [20, 21, 22].

In this study, we evaluate the role of the Wnt pathway in maintenance of BCP-ALL neoplastic cells, and its effects on determining the sensitivity to chemotherapy. Gene expression profiling studies revealed that BCP-ALL cells do express several members of the Wnt pathway and BCP-ALL cells are potentially sensitive to modulators effects of the members of the Wnt pathway. Our results show that Nalm-6 cells are virtually devoid of β -catenin, while Nalm-16 cells express higher levels of β -catenin but the protein is mainly located at the cell membrane, suggesting that canonical signaling is not required for BCP-ALL

maintenance. Activation of the canonical Wnt pathway with the Wnt3a protein induced BCP-ALL cell death and an increased sensitivity to etoposide (VP-16). This cytotoxic effect was also induced by lithium chloride (LiCl), suggesting that GSK-3 β is involved in it. In turn, incubation with Wnt5a or Dkk-1, increased survival rates of Nalm-16 cells and treatment with canonical antagonists protected leukemic cells from chemotherapy-induced cell death. Based on these results, it could be speculated that activation of canonical Wnt signaling could be a novel therapeutic target to induce cytoreduction and enhance the sensitivity to chemotherapy of BCP-ALL cells.

Materials and Methods

Leukemic Cell Lines and Patient Samples. BCP-ALL cell lines were kindly provided by Dr. Maria Isabel Doria Rossi, Federal University of Rio de Janeiro, Brazil). Nalm-16 and Nalm-6 had been originally established from peripheral blood of BCP-ALL relapsed patients. According to the EGIL criteria, Nalm-16 and Nalm-6 were characterized as BII/common BCP-ALL (CALLA⁺) and BIII/Pre-B ALL, respectively [23]. Cell lines were maintained in RPMI-1640 medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS; Cultilab, Campinas, SP, Brazil), 100 U/mL G sodium penicillin, 100 µg/mL streptomycin, 2 mM L-glutamine, 1 mg/mL sodium pyruvate, 40 µM essential amino acids, and 40 µM non-essential amino acids (all from Gibco-BRL, Gaithersburg, MD). (pH = 7.2). Jurkat T-cell acute lymphoblastic leukaemia was obtained from the Rio de Janeiro Cell Bank, (Federal University of Rio de Janeiro, Brazil). Jurkat cell line was cultured in Iscove's medium (Gibco-BRL) supplemented with 10% FCS, 100 U/mL penicillin and 100 mg/mL streptomycin. In all cases, cultured cells were maintained at 37⁰C in humidified atmosphere with 5% CO₂.

BM cells were obtained from the left-over material harvested from the posterior iliac crest from two BM transplantation donors and five children BCP-ALL (mean age of 4.2 years, range 2 months- 8 years). BM mononuclear cells (BMMCs) were isolated by density gradient on Ficoll-Hypaque (Pharmacia, Uppsala, Sweden) and cryopreserved in liquid nitrogen until use. B-cells were purified from BMMCs using the B-Cell Negative Selection Kit from Dynal (Oslo, Norway), following the manufacturer's instructions (final B-cell purity of >98%).

BMMC were plated in Iscove's medium supplemented with 10% FCS, 100 U/mL G sodic penicillin and 100 µg/mL streptomycin. Weekly, half of the supernatant containing non-adherent cells was removed and replaced with fresh medium; when monolayers were established, cells were trypsinized and plated under the same conditions. Since macrophages are trypsin-resistant, after two replating steps an adherent non-hematopoietic cell population was obtained, designated hereafter as "stroma".

All the patients' samples were collected after informed consent, following authorization and in accordance with the Human Ethics Committee of the "Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira" (Rio de Janeiro, RJ, Brazil).

Immunofluorescence microscopy and digital image acquisition For immunofluorescence microscopy, cultures were rinsed with phosphate buffered saline (PBS) and fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 10 min at room temperature (RT). Cells were then permeabilized and washed with 0.5% Triton-X 100 (Sigma) in PBS and were incubated with a rabbit anti-β-catenin polyclonal antibody (Sigma), at a 1:100 vol/vol dilution, for 1 h at 37°C. After this incubation period, cells were washed and incubated with a FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody (1 h at 37°C) and washed in PBS. Then the cell nuclei was stained by adding a solution containing DAPI (0.1 µg/mL in 0.9% NaCl) for 5 min (RT). Finally, cells were washed and mounted in glycerol containing 5% n-propyl gallate, 0.25% DABCO (1,4-diazabicyclo(2,2,2)octane) and 0.0025% para-phenylenediamine (w/w; all from Sigma). Cells were examined with an Axiovert 100 epifluorescence inverted optical microscope (Carl Zeiss, Oberkochen,

Germany) and images acquired with a C2400i integrated CCD camera (Hamamatsu Photonics, Shizuoka, Japan) using an Argus 20 image processor (Hamamatsu Photonics). Digital images were transferred to a Dell Optiplex GX270 computer (Dell Corporate, Round Rock, TX) and plates were mounted using Adobe Photoshop (Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA). Control experiments with no primary antibodies showed only a faint background staining (data not shown).

Western Blot Analysis 1.5×10^7 cells were lysed in 100 μ l ice-cold RIPA buffer (0.05M Tris-HCl pH 7.4, 0.15M NaCl, 1% NP-40, 0.25% sodium deoxycholate, 2 mM EDTA, 1 mg/mL pepstatin, 1 mM PMSF, 1 mM NaF, 1 mM Na_3VO_4). The protein concentration in the cell lysate was determined by the method of Lowry *et al* [24]. Samples were mixed with sample buffer - 0.02 mM dithiotreitol (DTT); 1.38 mM sodium dodecyl sulfate (SDS); Tris-HCl 125 mM, pH 6.8 and; 20% glycerol) and resolved using an SDS-polyacrylamide 12% gel electrophoresis (SDS-PAGE); then they were electroblotted and transferred to a nitrocellulose membrane (HybondTM-P, Amersham Biosciences, São Paulo, Brazil). Membranes were treated with a blocking solution containing 5% non-fat dry milk in 0.001% Tris-buffered saline-Tween 20 (TBS-T) for 1 h and then incubated overnight with the primary polyclonal antibody for β -catenin (Sigma, 1:2000 dilution). Monoclonal anti α -actin (clone C4, Chemicon, Hofheim, Germany, 1:2000 dilution) was also employed to compare loading of the samples. Secondary anti-mouse HRP-conjugated antibodies (1:2000, Promega, Madison, WI) were then added and cells incubated for 1 h at room temperature. The blot reaction was visualized using the chemiluminescence detection kit luminol (Super Signal West Pico, Pierce, Rockford, IL). For the analysis of the intensity of the stained band,

Image J software (NIH) was used, results being expressed as arbitrary units (AU).

Generation of Wnt3a Conditioned medium Mouse Wnt3a transfected cells (L-Wnt3a) and control non-transfected L-cells were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) and cultured in Dulbecco's medium (DMEM; Sigma) supplemented with 10% FCS, 4 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin. L-Wnt3a culture medium was supplemented with 0.4 mg/ml G-418 (Gibco-BRL) to maintain transgene expression during cell culture expansion. Conditioned medium from L-Wnt3a or control L-cells were collected according to the manufacturer's instructions. Briefly, cells were passed at 1:10 dilution in 10 mL medium without G-418 and left to grow for 4 days. Medium was collected from each cell line and replaced with 10 mL of fresh medium for another 3 days. The second batch of medium was then collected and the cells discarded. Both batches were mixed, sterile-filtered (0.2 µm) and stored at -20°C until required. Activity of the conditioned medium was tested by the TCF/LEF luciferase reporter assay as described below.

Cell Transfection and Luciferase Activity Assay. HEK 293T cells cultured in 96-well plates to 80% confluence were transfected with pGal (for β-galactosidase expression), Fop-Flash (negative control luciferase reporter mutated in the TCF/LEF binding site) and Top-Flash (luciferase reporter containing TCF/LEF binding site) plasmids using Lipofectamine 2000 transfection reagent (Invitrogen, Carlsbad CA). A DNA/Lipofectamine mixture was added to cells and maintained for 6 h at 37°C. DMEM with 10% FCS was added to cells that were let to recover overnight. Then, cells were incubated for 18 h with 10% diluted conditioned medium from L-Wnt3a or L-control cells. After this incubation period, cells were lysed with lysis buffer (Promega, Madison, WI). Luciferase activity was detected

by adding the enzyme substrate according to the manufacture's protocol and samples were read in a Tecan GENios Luminometer (Tecan Group Ltd., Mannedorf, Switzerland). β -galactosidase activity was measured by adding ONPG reagent to each well, and read using a spectrophotometer. In order to normalize the data, the luciferase activity index was calculated by dividing the luciferase values by the β -galactosidase ones.

Modulation of the Wnt Pathway. Nalm-16 cells were plated at 3×10^5 cells/mL in 24-well plates in the presence or absence of 10^{-6} M etoposide (VP-16, Oncosídeo; Quiral Química SA, Juiz de Fora, MG, Brazil) and 10 % L-control or L-Wnt3a conditioned medium, as indicated. To test the effect of purified proteins of the Wnt pathway on cell proliferation and survival, either the canonical activator Wnt3a protein or the Wnt5a, Dkk-1, SFRP-1 canonical inhibitors, (R&D Systems Minneapolis, MN) were added (100 ng/mL) to the cell culture medium. To investigate the potential role of GSK3- β in survival of BCP-ALL Nalm-16 cells were also incubated with LiCl (Sigma) at 3 or 5 mM, as indicated.

Analysis of Cell Cycle and Cell Death. After 24, 48 and 72 h of culture, cells were collected and their viability was measured by Trypan dye exclusion assay. Double stainings with Annexin V-FITC (1:10 dilution, Molecular Probes, Eugene, OR) for apoptotic cells and Propidium Iodide (PI; Sigma) for dead cells, were performed according to the manufacturer's instructions and measured in a FACSCalibur flow cytometer (BDB, San José, CA) for a total of 30.000 events. DNA cell contents were monitored by flow cytometry after PI staining according to Vindelov *et al* [25], at 24, 48 and 72 h. Cells with sub-diploid DNA content

peaks (sub-G0) were excluded from cell cycle analysis. FACS data were analyzed using the Infinicyt software (Cytognos, Salamanca, Spain).

RNA Isolation and Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). Total RNA was extracted from leukemic cells and normal BM stromal cells using TRIzol[®] Reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. cDNA was first synthesized from 2 µg total RNA using 1 µL oligo dT primers (500 µg/mL) and 1 µL Moloney Murine Leukaemia Virus Reverse Transcriptase (M-MLV-RT; 200 U/mL) (both from Invitrogen). The resulting cDNA was used with gene-specific oligonucleotide primers for PCR amplification. The primer sequences with annealing temperature and product size are listed in Table 1. Forward and reverse oligonucleotide primers were designed using the Primer 3 program (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi). RT-PCR was performed in a TGradient thermal gradient cycler (Biometra, Göttingen, Germany); PCR products were submitted to electrophoresis in 2% agarose gels and stained with ethidium bromide. Glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (GAPDH) was used as an internal control. Negative control was the PCR reaction mix lacking cDNA. As a positive control for Wnt3a expression, total RNA from whole B6CBA mouse embryos on days 8 - 10 after fertilization, was used; for LEF-1, Fzd-3, Dkk-1, SFRP-1 and SFRP-2, normal BM stroma was used as positive control, and; for Wnt5a, Jurkat cells were used as positive control.

Statistical Methods. Statistical significance was determined using the unpaired student T and the non-parametric Mann-Whitney U tests (Prism 2.01 software; GraphPad, San Diego, CA). $P < 0.05$ was considered to be associated with statistically significant.

Results

Nalm-6 is virtually devoid of β -catenin while Nalm-16 expresses higher levels of cell membrane but not nuclear β -catenin.

Since nuclear β -catenin is the hallmark of the activated canonical Wnt signaling pathway, our first goal was to evaluate the expression and distribution of β -catenin on BCP-ALL cell lines. Our results showed that Nalm-6 was virtually devoid of β -catenin expression as found by western blot assay (Figure 1). In contrast, Nalm-16 cells expressed β -catenin at levels similar to the positive control (Jurkat cells). However, in Nalm-16 cell line, the distribution of β -catenin as assessed by immunofluorescence was predominantly located on the cell membrane (Figure 1), being confined to cell adhesion complexes at cell membranes.

Activation of the canonical Wnt pathway induces death of Nalm-16 cells while Wnt5a and Dkk-1 increase their survival rates

In order to investigate the role of canonical Wnt activation on BCP-ALL cell survival, we treated Nalm-16 cells with either a classical canonical Wnt activator (Wnt3a) or canonical Wnt inhibitors (Wnt5a, Dkk-1, SFRP-1). Wnt3a clearly induced death of Nalm-16 cells, decreasing the viability by around 50% at 48 h (Figure 2 A). Conversely, incubation with either Wnt5a or Dkk-1, increased survival rates of Nalm-16 cells over control values. Although SFRP-1 at the concentration tested showed a slight tendency to increase cell survival, no statistically significant differences were observed (Figure 2 A and B). In addition, we also tested whether LiCl, which inhibits GSK-3 β and mimics Wnt signaling by

stabilizing β -catenin, could also play a similar role to the activation of canonical Wnt pathway on cell survival. LiCl clearly decreased cell survival, supporting the notion that GSK-3 β activity regulates survival of BCP-ALL cells. Cell death was more pronounced at the lowest FCS concentration (Figure 3, A-D). These results suggest that inhibition of canonical Wnt signaling may play an important role on BCP-ALL maintenance.

Activation of the canonical Wnt pathway enhances sensitivity of Nalm-16 cells to chemotherapy while canonical inhibitors induce drug resistance

To determine the effects of Wnt activation on BCP-ALL cell survival after chemotherapy, Nalm-16 cells were treated with Wnt3a-conditioned medium (CM) plus 1 μ M VP-16. The activity of the conditioned medium had been previously tested on HEK 293T cells transfected with TCF/LEF reporter plasmid, showing that Wnt3a-CM was able to induce canonical activation as observed by the increased reporter activity (Figure 4, A). When Wnt3a-containing medium was added to cell cultures with 1 μ M VP-16, a significant decrease in the number of viable cells without an overall change in total cell numbers was observed (figure 4, panels B to D). The maximum effect was attained after 48 h, when viability decreased around 40% with the Wnt3a-treatment (figure 4C). In order to ensure that Wnt proteins were responsible for the effects observed, we also exposed Nalm-16 in the presence of VP-16 to the purified Wnt3a protein, a marked decreased viability of around 50% being also observed under these conditions (Figure 5A). Conversely, incubation with canonical Wnt antagonists (Wnt5a, Dkk1 and SFRP-1) clearly enhanced Nalm-16 drug resistance (Figure 5A and 5B).

Our results indicate that *in vitro* canonical Wnt activation has a negative impact on cell survival following chemotherapy, while canonical antagonists (Wnt5a, Dkk-1 and SFRP-1) protect leukemic cells from etoposide-induced cell death.

Modulation of the Wnt pathway does not modify the cell proliferation status

Since maintenance of the cellular pool is a balance between cell proliferation and survival, we also investigated whether modulation of the Wnt pathway could also play a role in modulating cell cycle distribution of BCP-ALL cells. Accordingly, Nalm-16 cells were treated with purified proteins of the Wnt pathway (activators and inhibitors) and DNA cell contents were determined by PI staining at 24, 48 and 72 h. Surprisingly, neither the activation nor the inhibition of Wnt pathway had an impact on the cell cycle distribution of viable Nalm-16 cells in culture (Figure 6).

BCP-ALL gene expression profile corroborates the functional findings related to the Wnt pathway.

Molecular analysis of mRNA expression by BCP-ALL cell lines and CD19⁺ BCP-ALL patients' cells using RT-PCR is shown in figure 7. As shown there, both BCP-ALL cell lines and patient samples expressed LEF-1 and Fzd-3 transcripts, indicating that leukemic cells are potentially sensitive to Wnt signals. In line with our findings indicating that Wnt3a could act as a tumor suppressor gene for BCP-ALL cells, Wnt3a mRNA expression was completely absent in both cell lines as well as in all patient samples tested. In addition, neither BCP-ALL cell lines nor

patient samples expressed Wnt5a transcripts while Dkk-1 mRNA was expressed in patient samples but not in the cell lines tested, suggesting that primary leukaemia cells are still dependent on external survival signals. SFRP-1 and SFRP-2 mRNA were absent in all cell lines tested while SFRP-2 transcripts were expressed at low levels by two patients and absent in another two samples, also suggesting that, at least in some cases, primary leukaemia cells are dependent on survival signals. Also, Dkk-1, SFRP-1 and SFRP-2 mRNA were expressed by normal BM stromal cells.

Discussion

The idea of designing targeted-therapy was first conceived in the early 1900's by Paul Ehrlich, who named "magic bullets" the compounds that could specifically attack diseased cells. In order to develop such specific treatment against tumor cells, it is mandatory to understand the deregulated signaling pathways underlying neoplastic conditions. Here, we describe the involvement of the Wnt signaling pathway in the maintenance of BCP-ALL cells before and after chemotherapy.

An increasingly body of evidence has emerged in the literature concerning the role of Wnt/ β -catenin pathway in B cell malignances. Inhibition of GSK-3 β activates β -catenin-mediated transcription and enhances survival of chronic lymphocytic leukaemia (CLL) cells [14]. Malignant multiple myeloma cells overexpress β -catenin and stimulation with either Wnt3a or LiCl induces further accumulation of nuclear β -catenin and increases cell proliferation [15]. Conversely, Yaccoby *et al.* [16] have shown that Dkk-1 enhanced tumor-induced bone resorption and multiple myeloma growth *in vivo*, providing conflicting results about the precise role of the Wnt/ β -catenin pathway.

After canonical Wnt activation, β -catenin is translocated into the nucleus where together with LEF-1 induces transcriptional activation [26]. Although the BCP-ALL cell lines studied here constitutively expressed LEF-1 mRNA, low levels of total β -catenin and predominant membrane distribution were found in Nalm-6 and Nalm-16 cells, respectively, strongly suggesting downregulation of the canonical Wnt pathway in these cells. Serinsöz *et al* [22] have shown that β -catenin is inversely expressed in acute myeloid leukaemia (AML) and ALL, no β -

catenin expression being identified in ALL cells obtained from formalin-fixed, paraffin-embedded BM trephines. However, expression of both the LEF-1 and Fzd-3 receptor mRNAs shown here suggest that leukemic cells are potentially sensitive to Wnt external stimulation. Thus, although the canonical pathway is not constitutively activated, the Wnt/ β -catenin pathway could be used to modulate leukemic cells behavior.

Wnt3a has been by far the most widely investigated canonical agonist of the Wnt pathway, even though its role in BCP-ALL remains controversial. Accordingly, while some authors have described Wnt3a as an important mediator of cell survival and proliferation, others have found that Wnt3a inhibits proliferation of BCP-ALL cells but does not modify their survival rates [20, 21]. In this study, Wnt3a strongly decreased survival of leukemic cells without modifying the cell cycle distribution of viable cells. This data is in accordance to a recent work by Zhao *et al* [27] that have shown that lack of β -catenin in BCR-ABL-transduced hematopoietic cells allows progression of B-ALL in a murine model. In line with this, we found that treatment with LiCl, a well-known agent that mimics canonical Wnt signaling by blocking GSK-3 β , also increased leukemic cell death. Although LiCl is generally thought to have anti-apoptotic effects, particularly in neural cells, it has also been shown to induce apoptotic death in several cell lines, such as promyelocytic leukaemia HL-60 cells, erytroleukaemia K562 cells, and monkey kidney COS7 cells. The factors responsible for such apoptotic effects are largely unknown, but studies of Van Gijn *et al.* [28] have shown that accumulation of β -catenin can induce apoptosis, further supporting a role for β -catenin in LiCl-mediated cell death. Moreover, β -catenin overexpression by itself can induce apoptosis independently of LEF-1

[29]. Therefore, canonical activation of the Wnt pathway may have a negative impact on leukemic cell survival. We also demonstrated here that incubation with the canonical Wnt inhibitors Wnt5a and Dkk-1 was associated with an increased cell survival, reinforcing the benefits of canonical inhibition for maintenance of BCP-ALL cells.

The increased sensitivity to VP-16 induced by Wnt3a together with the absence of Wnt3a mRNA in all patient samples and cell lines studied emphasizes its negative role on leukemic cell survival. BM stromal cells, known to play a pivotal role on leukemic cell maintenance by providing survival signals, are also completely devoid of Wnt3a [30]. Altogether, our results clearly suggest that, at least in our model, Wnt3a behaves as a *bona fide* tumor suppressor gene, inducing cell death in malignant cells, both under normal conditions as well as after genotoxic challenge with etoposide.

The mechanism underlying Wnt3a-induced sensitivity to etoposide remains largely unknown. We showed here that none of the Wnt modulators was able to modify cell proliferation, and this mechanism is probably not involved in increased sensitivity. In turn, sensitivity to etoposide could be at least partially explained by the increased expression of topoisomerase II α following Wnt3a treatment, as demonstrated by Khan *et al* [21]. Since etoposide is a specific DNA topoisomerase-II inhibitor, the increased amount of molecular drug target induced by Wnt3a may increase the sensitivity to this drug.

In contrast to recent findings suggesting that Wnt5a acts a tumor suppressor gene and its inactivation may confer a poor prognosis [31], we found that Wnt5a protects leukemic cells from chemotherapy-induced cell death. Such apparent discrepancy may reflect differences between the models used in both studies. In

line with our findings, Wnt5a has been shown to inhibit the canonical Wnt pathway by promoting β -catenin degradation through a GSK3- β independent mechanism [9]. Here we showed that two other canonical Wnt antagonists (e.g. Dkk-1 and SFRP-1), also induce BCP-ALL drug resistance. These results support previous observation [19] showing that the same canonical Wnt antagonists are capable of inducing drug resistance in AML as efficiently as cell adhesion; in this work De Toni *et al* [19] also demonstrated that leukemic cell adhesion to osteoblasts induced secretion of SFRP-1, reinforcing resistance to chemotherapy by a double resistance mechanism (adhesion and anti-Wnt production).

Production of Wnt antagonists by leukemic cells or BM stroma could contribute to the protective effects of BM niches against chemotherapy in BCP-ALL. Here, we show the existence of constitutive Dkk-1 and SFRP-2 mRNA expression by CD19⁺ cells from BCP-ALL patients, but not by established BCP-ALL cell lines, which may reflect dependency of primary leukaemia on external survival signs. The absence of SFRP-2 mRNA in two patient samples may be due to undetectable expression levels or indicate variability among patients. Importantly, Dkk-1, SFRP-1 and SFRP-2 mRNAs were expressed by normal stromal cells, which could contribute to BCP-ALL cell survival through crosstalk between leukemic cells and the supportive BM microenvironment. Although we could not find Wnt5a mRNA expression neither in BCP-ALL cell lines nor in patient samples, a work by Etheridge *et al.* [30] has demonstrated Wnt5a expression in BM stromal cells, which could provide Wnt5a signal to leukemic cells.

In summary, our results strongly suggest that canonical Wnt3a behaves as tumor suppressor gene and inhibition of this pathway may support BCP-ALL cell

survival. In addition, canonical activation of the Wnt pathway may enhance sensitivity to chemotherapy and its inhibition promotes drug resistance. These results would support the development of novel targeted-therapies capable of inducing leukemic cell death, and enhancing response to chemotherapy in BCP-ALL.

Acknowledgments

We acknowledge Dr. Alex Balduino for providing L cells, Pharmacy staff from Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF, UFRJ, Brazil) for providing VP-16 and Prof. Julia Almeida (Cytometry Service, University of Salamanca) for her helpful comments. We wish also to thank to all patients that contributed to this work. This work received support from CAPES/Ministério da Educação–Brasília–Brazil, Programa Interinstitucional de Ensino, Pesquisa e Extensão em Biologia do Câncer– (UFRJ, Brazil), CNPq/Ministério de Ciência e Tecnologia–Brasília (Brazil), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) and Rio de Janeiro Cell Bank /APABCAM, Rio de Janeiro (Brazil). L.S.T. is a recipient of the Capes scholarship.

Authorship

Contribution: L.S. Thiago and R. Borojevic contributed to the concept and design, interpreted and analyzed data, provided drafting of the article, provided critical revisions and important intellectual content, obtained a funding source, gave final approval, supplied statistical expertise, collected and assembled data. E.S. Costa collected and analyzed data, provided drafting of the article and critical revisions. D.V. Lopes, F.A.Mendes, D.M. Portilho, J.G. Abreu, C.S. Mermelstein collected and analyzed data. I.B. Otazu obtained a funding source, collected and analyzed data. A.E. Nowill provided patient samples and provided administrative support. A. Orfao analyzed data and provided drafting of the article. M.I.D. Rossi provided critical revisions and important intellectual content.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial

interests.

Correspondence: Leandro de Souza Thiago, Banco de Células do Rio de Janeiro, Hospital Universitário Clementino Fraga Filho 4° andar, sala 4A9, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21941-590 Cidade Universitária, Rio de Janeiro, Brasil, Tel: (55) (21) 2562-2468, Fax: (55) (21) 2562-6483, E-mail address: leandrothiago@terra.com.br.

References

1. Pui, C-H; Relling, M.V., Campana, D. & Evans, W.E. (2002) Childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Reviews in Clinical and Experimental Hematology*, 62, 161-179
 2. Manabe, A., Murti, K.G., Coustan-Smith, E., Kumagai, M., Behm, F.G., Raimondi, S.C. & Campana D. (1994) Adhesion dependent survival of normal and leukemic human B lymphoblasts. *Blood*, 83, 758-766
 3. Kumagai, M., Manabe, A., Pui, C.H., Behm, F.G., Raimondi, S.C., Hancock, M.L., Mahmoud, H., Crist, W.M. & Campana, D. (1996) Stroma-supported culture of childhood B-lineage acute lymphoblastic leukaemia cells predicts treatment outcome. *Journal of Clinical Investigation*, 97, 755-760
 4. Kléber, M. & Sommer, L. (2004) Wnt signaling and the regulation of stem cell function. *Current Opinion in Cell Biology*, 2004, 16, 681-687
 5. Staal, F.J.T. & Clevers, H.C. (2005) Wnt signalling and haematopoiesis: a wnt-wnt situation. *Nature Reviews Immunology*, 5, 21-30
 6. Dann, C.E., Hsieh, J.C., Rattner, A., Sharma, D., Nathans, J. & Leahy, D.J. (2001) Insights into Wnt binding and signalling from the structures of two Frizzled cysteine-rich domains. *Nature*, 412, 86-90
 7. Willert, K. & Jones, K.A. (2006) Wnt signaling: is the party in the nucleus? *Genes & Development*, 20, 1394-1404
-

8. Gordon, M.D. & Nusse, R. (2006) Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 22429-22433.
 9. Topol, L., Jiang, X., Choi, H., Garrett-Beal, L., Carolan, P.J. & Yang, Y. (2003) Wnt-5a inhibits the canonical Wnt pathway by promoting GSK-3-independent beta-catenin degradation. *The Journal of Cell Biology*, 162, 899-908.
 10. Brabletz, T., Jung, A., Reu, S., Porzner, M., Hlubek, F., Kunz-Schughart, L.A., Knuechel, R. & Kirchner, T. (2001) Variable β -catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98, 10356-10361.
 11. Suzuki, H., Watkins, D.N., Jair, K.W., Schuebel, K.E., Markowitz, S.D., Chen, W.D., Pretlow, T.P., Yang, B., Akiyama, Y., Van Engeland, M., Toyota, M., Tokino, T., Hinoda, Y., Imai, K., Herman, J.G. & Baylin, S.B. (2004) Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive Wnt signaling in colorectal cancer. *Nature Genetics*, 36, 417-422.
 12. Polakis, P. (2007) The many ways of Wnt in cancer. *Current Opinion in Genetics & Development*, 17, 45-51
 13. Chung, E.J., Hwang, S.G., Nguyen, P., Lee, S., Kim, J.S., Kim, J.W., Henkart, P.A., Bottaro, D.P., Soon, L., Bonvini, P., Lee, S.J., Karp, J.E., Oh, H.J., Rubin, J.S. & Trepel, J.B. (2002) Regulation of leukemic cell adhesion, proliferation, and survival by β -catenin. *Blood*, 100, 982-990
-

14. Lu, D., Zhao, Y., Tawatao, R., Cottam, H.B., Sen, M., Leoni, L.M., Kipps, T.J., Corr, M. & Carson, D.A. (2004) Activation of the Wnt signaling pathway in chronic lymphocytic leukaemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101, 3118-3123
 15. Derksen, P.W., Tjin, E., Meijer, H.P., Klok, M.D., MacGillavry, H.D., van Oers, M.H., Lokhorst, H.M., Bloem, A.C., Clevers, H., Nusse, R., van der Neut, R., Spaargaren, M., Pals, S.T. (2004) Illegitimate Wnt signaling promotes proliferation of multiple myeloma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101, 6122-6127
 16. Yaccoby, S., Ling, W., Zhan, F., Walker, R., Barlogie, B. & Shaughnessy, J.D. Jr. (2007) Antibody-based inhibition of DKK1 suppresses tumor-induced bone resorption and multiple myeloma growth in vivo. *Blood*, 109, 2106-11.
 17. Roth, W., Wild-Bode, C., Platten, M., Grimm, C., Melkonyan, H.S., Dichgans, J., Weller, M. (2000) Secreted-frizzled-related proteins inhibit motility and promote growth of human malignant glioma cells. *Oncogene*, 19, 4210-20
 18. Shou, J., Ali-Osman, F., Multani, A.S., Pathak, S., Fedi, P. & Srivenugopal, K.S. (2000) Human Dkk-1, a gene encoding a Wnt antagonist, responds to DNA damage and its overexpression sensitizes brain tumor cells to apoptosis following alkylation damage of DNA. *Oncogene*, 21, 878-889
 19. De Toni, F., Racaud-Sultan, C., Chicanne, G., Mas, V.M., Cariven, C., Mesange, F., Salles, J.P., Demur, C., Allouche, M., Payrastre, B.,
-

- Manenti, S. & Ysebaert, L. (2006) A crosstalk between the Wnt and the adhesion-dependent signaling pathways governs the chemosensitivity of acute myeloid leukaemia. *Oncogene*, 25, 3113-3122
20. Nygren, M.K., Døsen, G., Hystad, M.E., Stubberud, H., Funderud, S. & Rian, E. (2007) Wnt3a activates canonical Wnt signalling in acute lymphoblastic leukaemia (ALL) cells and inhibits the proliferation of B-ALL cell lines. *British Journal of Haematology*, 136, 400-413.
21. Khan, N.I., Bradstock, K.F. & Bendall, L.J. (2007) Activation of Wnt/beta-catenin pathway mediates growth and survival in B-cell progenitor acute lymphoblastic leukaemia. *British Journal of Haematology*, 138, 338-348
22. Serinsöz, E., Neusch, M., Büsche, G., Wasielewski, R., Kreipe, H. & Bock, O. (2004) Aberrant expression of beta-catenin discriminates acute myeloid leukaemia from acute lymphoblastic leukaemia. *British Journal of Haematology*, 126, 313-319
23. Matsuo, Y. & Drexler, H.G. (1998) Establishment and characterization of human B cell precursor-leukaemia cell lines. *Leukaemia Research*, 22, 567-579
24. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951) Protein measurement with folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275
-

25. Vindelov, L.L., Christensen, I. & Nissen, N.A. (1983) Detergent-trypsin method for the preparation of nuclei for flow cytometry. *Cytometry*, 3, 323-327
 26. Behrens, J., von Kries, J.P., Kühl, M., Bruhn, L., Wedlich, D., Grosschedl, R. & Birchmeier, W. (1996) Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature*, 382, 638-642
 27. Zhao, C., Blum, J., Chen, A., Kwon, H.Y., Jung, S.H., Cook, J.M., Lagoo, A. & Reya, T. (2007) Loss of beta-catenin impairs the renewal of normal and CML stem cells *in vivo*. *Cancer Cell*, 12, 528-541
 28. Van Gijn, M.E., Snel, F., Cleutjens, J.P.M., Smits, J.F.M. & Blankesteyn, W.N. (2001) Overexpression of Components of the Frizzled-Dishevelled Cascade Results in Apoptotic Cell Death, Mediated by β -Catenin. *Experimental Cell Research*, 265, 46-53.
 29. Kim, K., Pang, K.M., Evans, M. & Hay, E.D. (2000) Overexpression of beta-catenin induces apoptosis independent of its transactivation function with LEF-1 or the involvement of major G1 cell cycle regulators. *Molecular Biology of the Cell*, 11, 3509-3523
 30. Etheridge, S.L., Spencer, G.J., Heath, D.J. & Genever, P.G. (2004) Expression Profiling and Functional Analysis of Wnt Signaling Mechanisms in Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells*, 22, 849-860
 31. Jianming, Y., Hongyu, L., Yun-Wen, C., Gopesh, S., Zifen, G. & Qian, T. (2007) WNT5A is epigenetically silenced in hematologic
-

malignancies and inhibits leukaemia cell growth as a tumor suppressor, *Blood*, 110, 4130-4131

Legends

Figure 1. Overall expression of β -catenin in BCP-ALL cell lines. (Top) Immunofluorescence microscopical profiles of NALM-16 cells for total β -catenin (panel A), DAPI (panel B) and both β -catenin and DAPI (panel C). (Bar = 5 μ m) (Bottom of panel A). As shown, the majority of β -catenin was located at cell membrane (arrows). Western blot analysis for total β -catenin, (panel D) showed that Nalm-6 (N6) cells were virtually devoid of β -catenin protein in contrast to Nalm-16 (N16). For these experiments, Jurkat cells were used as positive control. Total β -catenin levels (mean \pm one standard deviation) from two independent experiments (expressed as arbitrary units; A.U.) are shown in panel E. (* $p < .0001$ - N6 versus N16).

Figure 2. Wnt3a induces death of Nalm-16 cells while Wnt5a and Dkk-1 increase their survival. Nalm-16 cells were treated with purified Wnt3a-canonical agonist or canonical antagonists as indicated. Viability was monitored by an Annexin V-FITC / Propidium Iodide (PI) double staining followed by FACS analysis. Canonical activation reduced BCP-ALL cell survival while Wnt5a and Dkk-1 increased survival rates. SFRP-1 did not show a significant impact on cell survival. Viability fold change was obtained from absolute Annexin-V⁻/PI⁻ cell count (panel A, arbitrary units) from three independent experiments carried out in triplicate (mean values and standard errors are shown). FACS profiles show results from 72 hours and is representative of three independent experiments (panel B). * $p < .01$ (Mann-Whitney U test)

Figure 3: Inhibition of GSK-3 β by LiCl induces Nalm-16 cell death and this effect is more pronounced at lower concentrations of fetal calfserum. Nalm-16 cells were treated with indicated LiCl concentrations, with 10% FCS (A, B) or 1% FCS (C, D). At the indicated times, viability was monitored by Trypan dye exclusion assay. Viable cell number (A, C) and viability fold change (B, D) are depicted. Results (means and standard errors) of two independent experiments carried out in triplicate are shown. * $p < .001$ (unpaired Student's t test).

Figure 4. Wnt3a-conditioned medium enhances the *in vitro* sensitivity of Nalm-16 cells to etoposide. HEK 293T cells transfected with the TCF/LEF reporter plasmid and conditioned media, were tested (panel A). Nalm-16 cells were simultaneously treated with 1 μ M etoposide and either 10% L-control or L-Wnt3a conditioned medium as indicated (panels B to D). At the indicated times, viability was measured by Trypan dye exclusion. Wnt3a-conditioned medium activated the Wnt pathway (arbitrary units) (panel A) inducing a decrease in the number of viable cells (panel B) but not in overall cell number (panel D). Viability fold change was calculated from absolute Annexin-V/PI cell count (panel C, arbitrary units). Results (means and standard errors) of two independent experiments carried out in triplicate are shown. * $p < .01$ (Mann-Whitney U test)

Figure 5. Wnt3a increases Nalm-16 sensitivity to etoposide while treatment with canonical Wnt antagonists induces drug resistance. Nalm-16 cells were treated with 10⁻⁶M VP-16 plus either purified Wnt3a-canonical agonist or canonical antagonists, as indicated. Viability was monitored by Annexin V-FITC / Propidium Iodide (PI) double staining followed by FACS analysis. Canonical

activation strongly increased cell death while canonical inhibition protected cells from etoposide-induced cell death. Viability fold change was obtained from absolute Annexin-V⁻/PI⁻ cell count (panel A; arbitrary units). Results (mean values and standard errors) of two independent experiments carried out in triplicate are shown. FACS profile shows results from 48 h and is representative of two independent experiments (panel B). *p < .05 (Mann-Whitney U test).

Figure 6. Activation or inhibition of Wnt pathway does not modify significantly the Nalm-16 cell proliferation status. Nalm-16 cells were treated with recombinant proteins and DNA contents were determined by PI staining at indicated times. Activation or inhibition of the Wnt pathway had no impact on the cell cycle distribution of viable cells. Results (mean value and standard error) of two independent experiments carried out in triplicate are shown.

Figure 7. Gene expression profiles: mRNA expression pattern of Wnt pathway members from childhood BCP-ALL cells. Total RNA was extracted from leukemic cells and normal bone marrow stromal cells, cDNA was synthesized and used with gene-specific oligonucleotide primers for PCR amplification, as specified. Negative control (C- or cPCR) and patient samples (A-E; A: BIII / Pre-B ALL, B, C and E: BII/ common ALL; D: BI / Pro-B ALL) are indicated.

OBS: As figuras são as mesmas apresentadas no corpo da tese e, por isso, não são repetidas aqui.

Table 1: RT-PCR Primers used for the detection of Wnt signaling pathway members

Primer	Forward (5'– 3')	Reverse (5'-3')	Tm	Product Size
Wnt5a	TTTTTCTCCTTCGCCCAGGTT GT	GGCTCATGGCGTTCACCA C	57.5	358 pb
Wnt3a	CTTTGCAGTGACACGCTCAT	GTGCTTCTCCACCACCATC T	63	234 pb
Fzd-3	GCTGTACTCACAGTTAACATG	GCTAAAATACCCTTGCTG ATTT	56	455 pb
LEF-1	CCAGCTATTGTAACACCTCA	TTCAGATGTAGGCAGCTG TC	57.5	420 pb
Dkk-1	TGGTCCAAGATCTGTAAACCT GTCC	CTGGCTTGATGGTGATCTT TCTGTA	67.5	149 pb
SFRP-1	CCAGTTTGCATTTGGATGTG	GGTCAGAACGGCCAGTAT GT	57.5	187 pb
SFRP-2	GCCTCGATGACCTAGACGAG	GATGCAAAGGTCGTTGTC CT	57.5	152 pb
GAPDH	ATCACCATCTTCGAGGAGCG	CCTGCTTACCACCTTCTT G	57.5	571 pb

ANEXO 4

Artigo submetido à publicação

Racemic Etodolac is cytotoxic and cytostatic for B-cell precursor Acute lymphoblastic leukemia cells

Running Title: Effects of Racemic Etodolac on BCP-ALL cells.

Leandro S. Thiago^{1*}; Elaine S. Costa²; Daiana V. Lopes¹ and Radovan Borojevic¹

¹Instituto de Ciências Biomédicas, and ²Instituto de Pediatria e Puericultura Martagão Gesteira – Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Rio de Janeiro, Brazil

*Corresponding Author and contact information for offprints:

Leandro de Souza Thiago,

Banco de Células do Rio de Janeiro, Hospital Universitário Clementino Fraga Filho 4º andar, sala 4A9, Universidade Federal do Rio de Janeiro,

21941-590 Cidade Universitária, Rio de Janeiro, Brasil

Tel: (55) (21) 2562-2468

Fax: (55) (21) 2562-6483

e-mail address: leandrothiago@terra.com.br

Support: This work received support from CAPES/Ministério da Educação– Brasília–Brazil, Programa Interinstitucional de Ensino, Pesquisa e Extensão em Biologia do Câncer– Instituto de Ciências Biomédicas (UFRJ, Brazil) and Rio de Janeiro Cell Bank /APABCAM, Rio de Janeiro (Brazil). L.S.T. is a recipient of the Capes scholarship.

SUMMARY

Objective. Several epidemiological studies have provided evidence that administration of nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs) could have therapeutic effect in cancer and induce apoptosis in malignant cells. Our goal was to evaluate the biological effect of Etodolac treatment on proliferation and cell survival in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL) cells.

Materials and Methods. Nalm-16 and Nalm-6 BCP-ALL cell lines were treated with Etodolac or NS-398, a specific COX-II inhibitor. After 24, 48 and 72 h, viability was measured by Trypan dye exclusion assay and by double staining with Annexin V-FITC and Propidium Iodide (PI), followed by FACS acquisition. DNA content was determined by flow cytometry after PI staining at 24, 48 and 72 hours.

Results. Racemic Etodolac strongly induced cell death in both BCP-ALL cell lines ($P < 0.05$). The cytotoxic activity of Etodolac was not induced by a COX-II-dependent mechanism, since treatment with NS-398 had no effect on cell survival. Etodolac treatment also decreased cell proliferation in Nalm-16 BCP-ALL cell line through a COX-II independent mechanism in a time- and dose-dependent manner ($P < 0.0001$).

Conclusions. Our findings indicate that Etodolac is cytotoxic and blocks tumor cell growth in BCP-ALL through a COX-II independent mechanism. We suggest that Etodolac might be efficient as an adjuvant therapy by reducing tumor bulk and may induce consequently the cell cycle entry of dormant leukemia cells.

Keywords: B- cell precursor Acute Lymphoblastic Leukemia, Etodolac, Apoptosis, Tumor growth, Treatment.

Introduction

B-cell precursor Acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL) is a malignancy characterized by progressive accumulation of immature clonal B cell precursors in the bone marrow (BM). Nowadays, around 80% of all newly diagnosed pediatric patients become long- term survivors after adequate multi-agent chemotherapy protocols administered according to the individual patient risk category [1].

Nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs) are a large group of drugs with analgesic, antipyretic and anti-inflammatory properties [2]. Several epidemiological studies have provided evidence that administration of NSAIDs could have a prophylactic effect against some cancers such as sporadic colorectal cancer [3, 4], lung cancer [5] and leukemia [6]. Studies of animal models have also shown that these drugs could suppress colon carcinogenesis [7]. Indeed, various NSAIDs have been shown to induce apoptosis in malignant cells [8, 9].

Etodolac is a safe NSAID used for osteoarthritis, rheumatoid arthritis and for management of acute pain for more than twenty years [2, 10]. Etodolac is a racemic mixture of two enantiomers, R and S, each one with different pharmacological properties [11]. The most studied molecular target of NSAIDs is the cyclooxygenase (COX), as proposed by Vane [12]. COX is a key enzyme required for prostaglandin synthesis and is transcribed from two different genes. The two described proteins are COX-I, the constitutively expressed one, and COX-II, the inducible one. Besides its role in inflammation, COX-II has been found to be overexpressed in cancer of colon [13, 14], breast [15], lung [16, 17], pancreas [16] and mucous membranes of head and neck [17, 18, 19]. It is apparently relevant in tumor progression.

Increasing evidence has demonstrated that NSAIDs may also exert their

effects through COX-independent mechanisms [9, 20]. One of these targets is the peroxisome proliferators-activated receptor (PPAR) family of nuclear receptors that function as ligand-dependent transcription factors [21]. Three subtypes of PPAR (α , β/δ , γ) have been identified which exhibit distinct tissue distribution and are associated with selective ligands. Recently, PPAR γ was found to be expressed in human B-ALL and treatment with PPAR γ ligands induced growth inhibition and apoptosis [22].

Here, we describe that racemic Etodolac treatment decreases cell proliferation and induces apoptosis in BCP-ALL cell lines. These effects are COX-II independent since treatment with NS-398, a COX-II inhibitor, has not shown any of the effects observed. These results could encourage clinical trials to ensure the clinical benefits of Etodolac treatment, potentially as an adjuvant therapy.

Materials and Methods

Leukemia cell lines

BCP-ALL cell lines were kindly provided by Dr. Maria Isabel Doria Rossi (Federal University of Rio de Janeiro, Brazil). Nalm-16 and Nalm-6 had been originally established from peripheral blood of BCP-ALL relapsed patients. According to the EGIL criteria, Nalm-16 and Nalm-6 were characterized as BII/common BCP-ALL (CALLA⁺) and BIII/Pre-B ALL, respectively [23]. Cell lines were maintained in RPMI-1640 medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Cultilab, Campinas, SP, Brazil), 100 U/ml G sodium penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 2 mM L-glutamine, 1 mg/ml sodium pyruvate, 40 µM essential amino acids, and 40 µM non-essential amino acids (all from Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, USA). (pH = 7.2).

Etodolac Treatment. Racemic Etodolac was purchased from Sigma-Aldrich. The drug was dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich) and diluted in culture medium immediately before use. Nalm-16 or Nalm-6 cells were plated at 3×10^5 cells/ml in 24-well plates. They were treated with 250 or 500 µM Etodolac and compared to cells maintained in DMSO. In parallel, we treated cells with NS-398 (Biomol, Plymouth Meeting, PA, USA), a specific COX-II inhibitor, added at 10 µM concentration to the described cell culture medium.

Cell Cycle and Cell Death Analysis. After 24, 48 and 72 h culture cells were collected and their viability was measured by Trypan dye exclusion assay.

Double staining with Annexin V-FITC (1:10 dilution, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) for apoptotic cells and Propidium Iodide (PI; Sigma-Aldrich) for dead cells, done according to manufacturer's instructions, was followed by data acquisition using a FACSCalibur flow cytometer (BDB, San Jose, CA, USA). A total of 30.000 events were acquired. DNA content was monitored by flow cytometry after PI staining using the method of Vindelov *et al* [24] at 24, 48 and 72 hours. Cells with sub-diploid DNA content (sub-G0) were excluded from cell cycle analysis. A total of 10.000 events were acquired within live cells-gate. All FACS data were analyzed using Infinicyt software (Cytognos, Salamanca, Spain).

Statistical Methods. Statistical significance was determined using non-parametric Mann-Whitney U test, using Prism 2.01 software (GraphPad, San Diego, CA, USA). $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Racemic Etodolac induces cell death in BCP-ALL cell lines through a COX-II independent mechanism

In order to test the impact of Etodolac treatment on BCP-ALL cell survival, we treated Nalm-16 and Nalm-6 with increasing drug concentrations and compared to the vehicle (DMSO). We found that the assayed Etodolac doses strongly reduced viable cell expansion in both cell lines tested (Fig. 1, A and C). Etodolac treatment also decreased the total cell number (Fig. 1, B and D), suggesting a potentially relevant impact on slowing tumor growth. Since some of the effects of NSAIDs have been associated with COX-II inhibitory activities, we tested this hypothesis incubating BCP-ALL cells with NS-398, a well-known COX-II inhibitor. The cytotoxic activity of Etodolac was not induced by a COX-II-dependent mechanism (Fig.1, A-G). In order to better understand the kinetics of Etodolac-induced cell death, we used Annexin-V/PI double staining to identify all cell death stages. FACS analysis revealed that Etodolac treatment reduced cell survival, confirming the cytotoxic activity of Etodolac (Fig. 1, E) and revealed that this drug acts in a dose-dependent manner (Fig. 1, F). Immunophenotyping showed that Etodolac induced early apoptosis (Annexin-V⁺/PI⁻ staining) at 24 hours (data not shown). During cell culture progression, the treated leukemia cells were found in the late apoptosis (Annexin-V⁺/PI⁺) and the necrosis stage (Annexin-V⁻/PI⁺), as observed at 72 hours (Fig. 1, G). None of the controls or NS-398 modified the basal-cell death profile during all experiments. Our results clearly showed that Etodolac is cytotoxic to BCP-ALL cell lines.

Racemic Etodolac decreases cell proliferation in Nalm-16 BCP-ALL cell line through a COX-II independent mechanism in a time-and dose-dependent manner

Since Etodolac treatment led to overall reduction of cell number, we decided to evaluate whether this treatment also modulated cell cycle dynamics. No difference was found at 24 hours, but at 48 hours we found a marked difference in the S/G2/M fraction when comparing controls to the treated cells (Fig. 2, A-C). Figure 2B shows the S/G2/M change as compared to controls. Both drug doses decreased cell proliferation, and this effect was more pronounced at the higher dose (Fig. 2, A and B). Etodolac reduced S/G2/M fraction by 35% at 250 μM , while 500 μM reduced it by 50%. (Fig 2, B). The cytostatic activity of Etodolac was independent of COX-II inhibition (Fig.2, A-C).

Discussion

The design of new therapeutic strategies in BCP-ALL is pivotal to improve survival of patients with high risk of relapse, and to reduce the therapy side-effects in patients with low risk of relapse.

Here, we described for the first time to our knowledge the use of Etodolac, a classical NSAIDs, against BCP-ALL. Etodolac induced a considerable decrease of cell survival and of the overall cell number. This cytotoxic effect suggests that patients could benefit from Etodolac treatment to reduce the tumor bulk. We also showed that Etodolac dramatically decreased cell proliferation status in a dose-dependent manner, as found by low S/G2/M fraction after treatment. Although this is desirable in order to block tumor growth, this cell-cycle blockage effect may have important consequences on clinical management. Since conventional chemotherapy is preferentially directed to proliferative cells, the use of Etodolac may reduce efficiency of these drugs. An optimized approach could be the use Etodolac in the first seven days of treatment. Most of BCP-ALL therapy protocol guidelines recommend administration of prednisone or dexamethasone during this period of time [25, 26, 27]. Since this is a cell cycle-independent drug it could be combined with Etodolac, which could strongly help reducing tumor bulk and induce the cell cycle entry of dormant leukemia cells in the first seven days of treatment.

We have shown that these effects were not mediated by COX-II enzyme, since treatment with NS-398, a specific COX-II inhibitor, had no effect on cell survival or cell cycle. The mechanism of Etodolac action remains unknown. One possibility could be the PPAR- γ nuclear receptor, which was recently found to be

expressed in BCP-ALL cells, and treatment with PPAR- γ ligands led to growth inhibition and apoptosis [22]. Future works should focus on other COX-II-independent mechanisms of action and also perform *in vivo* animal studies and clinical trials to validate the efficacy and evaluate security of this drug on BCP-ALL patients.

Taken together, our findings suggest that Etodolac might be efficient in the treatment of BCP-ALL, by inducing apoptosis and blocking tumor cell growth.

Acknowledgments

This work received support from CAPES/Ministério da Educação–Brasília–Brazil, Programa Interinstitucional de Ensino, Pesquisa e Extensão em Biologia do Câncer– Instituto de Ciências Biomédicas (UFRJ, Brazil) and Rio de Janeiro Cell Bank /APABCAM, Rio de Janeiro (Brazil). L.S.T. is a recipient of the Capes scholarship.

References

1. Pui C-H, Relling MV, Campana D, Evans WE. Childhood acute lymphoblastic leukemia. *Rev Clin Exp Hematol* 2002; 62:161-179.
 2. Insel PA. Analgesic-antipyretics and anti-inflammatory agents: drugs employed in the treatment of rheumatoid arthritis and gout In: Gilman AG, Rall TW, Nies AS, Taylor P, eds. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 8th edn. New York: Pergamon Press, 1990: 638-681.
 3. Kune GA, Kune S, Watson LF. Colorectal cancer risk, chronic illnesses, operations and medications: case-control results from the Melbourne Colorectal Cancer Study. *Cancer Res* 1988; 48: 4399-4404.
 4. Rosenberg L, Palmer JR, Zauber AG, Warshauer ME, Stolley PD, Shapiro S. A Hypothesis: Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs Reduce the Incidence of Large-Bowel Cancer. *J Natl Cancer Inst* 1991; 83: 355-358.
 5. Schreinemachers DM, Everson RB. Aspirin use and lung, colon, and breast cancer incidence in a prospective study. *Epidemiology* 1994; 5: 138-146.
 6. Kasum CM, Blair CK, Folsom AR, Ross JA. Non-steroidal Anti-inflammatory Drug Use and Risk of Adult Leukemia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003; 12: 534-537.
 7. Rao CV, Rivenson A, Simi B, Zang E, Kelloff G, Steele V, et al. Chemoprevention of colon carcinogenesis by sulindac, a nonsteroidal anti-inflammatory agent. *Cancer Res* 1995; 55: 1464-1472.
-

8. Ding H, Han C, Zhu J, Chen CS, D'Ambrosio SM. Celecoxib derivatives induce apoptosis via the disruption of mitochondrial membrane potential and activation of caspase 9. *Int J Cancer* 2004; 113: 803-810.
 9. Vogt T, McClelland M, Jung B, Popova S, Bogenrieder T, Becker B, *et al.* Progression and NSAID-induced apoptosis in malignant melanomas are independent of cyclooxygenase II. *Melanoma Res* 2001; 11: 587-599.
 10. Vetter G, Placchi M, Joubert L. Comparative efficacy of etodolac and placebo in rheumatoid arthritic patients. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol* 1982; 20: 240-5.
 11. Demerson CA, Humber L G, Abraham NA, Schilling G, Martel RR, Pace-Asciak C. Resolution of etodolac and antiinflammatory and prostaglandin synthetase inhibiting properties of the enantiomers. *J Med Chem* 1983; 26: 1778-1780.
 12. Vane JR. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature* 1971; 231: 232-235.
 13. Jacoby RF, Marshall DJ, Newton MA, Novakovic K, Tutsch K, Cole CE, *et al.* Chemoprevention of spontaneous intestinal adenomas in the Apc Min mouse by the nonsteroidal anti-inflammatory drug piroxicam. *Cancer Res* 1996; 56: 710-714.
 14. Boolbol SK, Dannenberg AJ, Chadburn A, Martucci C, Guo XJ, Ramonetti JT, *et al.* Cyclooxygenase-2 overexpression and tumor formation are blocked by sulindac in a murine model of familial adenomatous polyposis. *Cancer Res* 1996; 56: 2556-2560.
-

15. DuBois RN, Tsujii M, Bishop P, Awad JA, Makita K, Lanahan A. Cloning and characterization of a growth factor-inducible cyclooxygenase gene from rat intestinal epithelial cells. *Am J Physiol* 1994; 266: 822-827.
 16. DuBois RN, Awad J, Morrow J, Roberts LJ, Bishop PR. Regulation of eicosanoid production and mitogenesis in rat intestinal epithelial cells by transforming growth factor-alpha and phorbol ester. *J Clin Invest* 1994; 93: 493-498.
 17. Xie WL, Chipman JG, Robertson DL, Erikson RL, Simmons DL. Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 2692-2696.
 18. Shattuck-Brandt RL, Varilek GW, Radhika A, Yang F, Washington MK, DuBois RN. Cyclooxygenase 2 expression is increased in the stroma of colon carcinomas from IL-10(-/-) mice. *Gastroenterology* 2000; 118: 337-345.
 19. Marnett LJ. Aspirin and the potential role of prostaglandins in colon cancer. *Cancer Res* 1992; 52: 5575-5589.
 20. Tegeder I, Pfeilschifter J, Geisslinger G. Cyclooxygenase-independent actions of cyclooxygenase inhibitors *FASEB J* 2001; 15: 2057-2072.
 21. Spiegelman BM. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma: A key regulator of adipogenesis and systemic insulin sensitivity. *Eur J Med Res* 1997; 2: 457-464.
-

22. Zang C, Liu H, Posch MG, Waechter M, Facklam M, Fenner MH, *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor ligands induce growth inhibition and apoptosis of human B lymphocytic leukemia. *Leuk Res* 2004; 28: 387-397.
23. Matsuo Y, Drexler HG. Establishment and characterization of human B cell precursor-leukemia cell lines. *Leuk Res* 1998; 22: 567-579.
24. Vindelov LL, Christensen I, Nissen NA. Detergent-trypsin method for the preparation of nuclei for flow cytometry. *Cytometry* 1983; 3: 323-327.
25. Aricò M, Conter V, Valsecchi MG, Rizzari C, Boccalatte MF, Barisone E, *et al.* Treatment reduction in highly selected standard-risk childhood acute lymphoblastic leukemia. The AIEOP ALL-9501 study. *Haematologica* 2005; 90: 1186-1191
26. Conter V, Aricò M, Valsecchi MG, Basso G, Biondi A, Madon E, *et al.* Long-term results of the Italian Association of Pediatric Hematology and Oncology (AIEOP) Acute Lymphoblastic Leukemia Studies, 1982-1995. *Leukemia* 2000; 14: 2196-2204
27. Schrappe M, Reiter A, Ludwig WD, Harbott J, Zimmermann M, Hiddemann W, *et al.* Improved outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia despite reduced use of anthracyclines and cranial radiotherapy: results of trial ALL-BFM 90. German-Austrian-Swiss ALL-BFM Study Group. *Blood* 2000; 95: 3310-3322
-

Fig 1. Etodolac induces cell death in BCP-ALL cell lines through a COX-II independent mechanism. Nalm-16 or Nalm-6 were treated with 250 or 500 μ M Etodolac and compared to vehicle controls. The effect of a COX-II inhibitor NS-398 was also evaluated. Viability was monitored by Trypan dye exclusion and assessed by Annexin V-FITC / propidium iodide (PI) double staining followed by FACS analysis. Viability fold change was obtained from absolute Annexin V⁻/PI⁻ cell number count. Etodolac reduced cell viable expansion of Nalm-16 (A) and Nalm-6 cells (C) and also reduced total cell expansion of Nalm-16 (B) and Nalm-6 cells (D). Results represent three independent experiments carried out in triplicate; mean values and standard errors are shown. FACS analysis revealed that Etodolac treatment reduced leukemic cell viability (E-G). Viability change at 72 hours evaluated by immunophenotyping is shown in F (Arbitrary Units). The * refers to significant statistical differences between controls and treated cells, and between different drug doses. These effects were not mediated by COX-II inhibitory activity (A-G). Results of two independent experiments carried out in triplicate; mean values and standard errors are shown. FACS profile shows results from 72 hours and is representative of one experiment (G). Vehicle 250 and Vehicle 500 are controls of Etodolac 250 μ M and Etodolac 500 μ M, respectively. * $P < 0.05$ (Mann-Whitney U test)

Fig 2. Racemic Etodolac mediates cell growth inhibition through a COX-II independent mechanism in a time- and dose-dependent manner. Nalm-16 cells were treated with 250 or 500 μM Etodolac and compared to vehicle controls. The effect of a COX-II inhibitor (NS-398, 10 μM) was also evaluated. DNA content was determined by PI staining at indicated times. Etodolac treatment dramatically reduced S/G2/M percentage in a time- and dose-dependent manner and this effect was not mediated by COX-II inhibitory activity (A-C). B shows S/G2/M change at 48 hours and the * represents statistical difference between the drug concentrations and between controls and treated cells (arbitrary units). Results of two independent experiments carried out in triplicate; mean values and standard errors are shown. FACS profile shows results from 48 hours and is representative of one experiment (C). Vehicle 250 and Vehicle 500 are controls of Etodolac 250 μM and Etodolac 500 μM , respectively. * $P < 0.0001$ (Mann-Whitney U test)

OBS: As figuras são as mesmas apresentadas no corpo da tese e, por isso, não são repetidas aqui.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)